

Dissertation

Chemische Synthese & funktionelle Analyse von immobilisierten Protein- Domänen

Auf dem Weg zu posttranslational-modifizierten Protein-Arrays durch eine
selbstreinigende Peptidsynthese

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)
im Fach Chemie

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Dipl.-Chem. Robert Zitterbart

Präsidentin der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. -Ing. Dr. Sabine Kunst
Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
Prof. Dr. Elmar Kulke

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. Oliver Seitz
 2. Prof. Dorothea Fiedler, PhD
 3. Prof. Dr. Christian Becker, Universität Wien

Datum der mündlichen Prüfung: 24.04.2017

Kurzzusammenfassung

Protein-Arrays sind das Mittel der Wahl, um eine Vielzahl von Proteinen parallel zu untersuchen. Eine große Anzahl an Proteinen wird dabei auf einer Oberfläche immobilisiert. Diese können simultan und mehrfach hintereinander mit einer Fülle von potentiellen Bindern zur Interaktion gebracht werden. Ziele dieser Untersuchungen sind meistens Proteininteraktionsnetzwerke zu entdecken oder besser verstehen zu können. Bisher wurden die benötigten Proteine fast ausschließlich mit biologischen Methoden gewonnen. Diese bieten allerdings keinen generellen Zugang zu posttranslational-modifizierten (PTM)-Proteinen. Somit war es bisher nicht möglich den Einfluss von PTMs auf Protein-Protein-Interaktionen (PPIs) im Arrayformat zu untersuchen. Die Chemische Synthese kann dagegen Proteine mit ortsspezifischen PTMs liefern. Daher ist es verwunderlich, dass bislang noch keine Berichte über chemisch hergestellte PTM-Protein-Arrays existieren, besonders da PTMs meist entscheidend für proteomische Interaktionsnetzwerke sind.

In der vorliegenden Arbeit wird eine Methodik beschrieben, die es ermöglicht PTM-modifizierte Protein-Domänen-Arrays auf der Oberfläche zu synthetisieren und zu analysieren. Dies wurde erreicht durch: (1.) Immobilisierung von *N*-terminalen Thio-Peptidhydraziden auf Aldehyd-modifizierten Mikrotiterplatten mit Hilfe der Hydrazonligation. (2.) Anschließende native chemische Ligation (NCL) mit Peptidthioestern, die mittels einer optimierten selbstreinigenden Peptidthioestersynthese erhalten wurden. (3.) Die beständige Oberflächenverankerung gestattet es, radikalische Entschwefelungsreaktionen durchzuführen. (4.) Die Ausbeute wird durch HRP-SA-Analyse überprüft. (5.) Zuletzt können die SH3-Domänen parallel auf ihre Affinitäten zu Fluorophor-markierten Bindern untersucht werden.

Mit der Methodik wurden 20 SH3-Domänen synthetisiert und 64 PPIs gemessen. Neben vier Hefe-SH3-Domänen wurden je acht humane (Phospho)SH3-Domänen der Abl- und Arg(Abl2)-Tyrosinkinase synthetisiert und funktionell untersucht. Es wurde gefunden, dass die Ligandenspezifität von Abl-SH3-Domänen durch Phosphorylierung feinreguliert wird. Je nach Phosphorylierungsmustern wurde die Affinität für spezifische Liganden erhöht oder erniedrigt. Der Ursprung dieser Phosphoregulierung wurde für die Abl-SH3-Domäne mit Hilfe der NMR-Spektroskopie und durch Zellexperimente versucht zu entschlüsseln.

Schlüsselwörter: chemische Proteinsynthese, Protein-Arrays, Phosphorylierung, native chemische Ligation, Entschwefelung, Immobilisierung, Abl, Arg, Pulldown

Abstract

Protein-arrays are the method of choice to investigate a variety of proteins in a parallel fashion. For that purpose, a large number of proteins are immobilized on a surface. These may interact simultaneously and repeatedly with a wealth of potential binders. Objectives of these studies are mostly to discover or to investigate protein interaction networks. So far, the necessary proteins were almost exclusively gained by biological methods. Unfortunately, generic access to proteins bearing post-translational modifications (PTM) is not provided by these techniques. Therefore, it was not possible to investigate the impact of PTMs on protein-protein-interactions (PPIs) on arrays so far. Chemical synthesis in contrast offers proteins with site-specific PTM incorporation. In this context, it is surprising, that chemical methods of PTM-protein array synthesis remained virtually unexplored, especially since these modifications are usually crucial for proteomic interaction networks.

In this thesis, a methodology is described, that allows to synthesize and functional analyse post-translationally modified protein domain arrays on the surface. This was achieved by: (1) Immobilization of *N*-terminal thiolated peptide hydrazides on aldehyde modified microtiter plates via hydrazone ligation. (2) Subsequent native chemical ligation (NCL) with biotinylated peptide thioesters, obtained by an optimized self-purifying peptide thioester synthesis, gave the full-length domain. NaCNBH₃ in ligation buffer reduced the hydrazone to a stable *N*-alkyl hydrazide. (3) The robust surface anchorage allowed a radical induced desulfurization to the native SH3 domains. (4) The synthetic-success could be quantified through the biotin load by an enzymatic HRP-SA assay. (5) The affinities of the SH3 domains for fluorophore-labeled binders were investigated in parallel.

By using this methodology, 20 SH3 domains were synthesized and 64 protein-peptide interactions were measured. In addition to 4 yeast SH3 domains, 8 human (phospho) SH3 domains of the Abl and Arg(Abl2) tyrosine kinase were synthesized and functionally investigated. The experiments revealed that phosphorylation might serve as a means to fine tune the ligand recognition. Depending on the phosphorylation pattern the affinity to specific interaction partners were enhanced or reduced. The origin of this phosphoregulation was further investigated for the Abl SH3 domain by means of NMR spectroscopy and cellular experiments.

Keywords: chemical protein synthesis, protein arrays, protein phosphorylation, native chemical ligation, desulfurization, immobilization, Abl, Arg, pulldown assay

„Wenn es uns gelingt, in dem dunklen Gebiet der organischen Natur auf einen lichten Punkt zu treffen, der uns wie einer der Eingänge erscheint, durch die wir vielleicht auf die wahren Wege zur Erforschung und Erkennung dieses Gebietes gelangen können, so hat man immer Ursache sich Glück zu wünschen, selbst wenn man sich der Unerschöpftheit des vorgesetzten Gegenstandes bewusst ist.“

– F. Wöhler und J. Liebig, Ann. Pharm. 1833, 3, 249

Diese Arbeit ist meiner Verlobten und meiner Tochter gewidmet, als Dank für die
Liebe, Entbehrungen und Unterstützung während ihrer Erstellung.

Die vorliegende Arbeit wurde im Arbeitskreis von *Prof. Dr. Oliver Seitz* am Institut für Chemie im Fachbereich für Organische und Bioorganische Chemie der *Humboldt-Universität zu Berlin* von April 2011 bis September 2016 angefertigt.

Inhaltsverzeichnis

1. Kapitel: Einleitung	1
2. Kapitel: Stand der Forschung	3
2.1 Die chemische Peptidsynthese – Stetige Erweiterung der Kettenlängen	3
2.2 Konvergente chemische Totalsynthese von Proteinen.....	6
2.2.1 Die Natürliche Chemische Ligation (NCL) ungeschützter Peptide	7
2.2.2 Die Expressed Protein Ligation (EPL)	9
2.2.3 NCL an cysteinfreien Verknüpfungsstellen	10
2.2.4 Synthese von Peptidthioestern nach der Fmoc/tBu-Strategie.....	13
2.3 Post-translationale Modifikationen in Peptiden & Proteinen.....	17
2.3.1 Proteinphosphorylierung	19
2.3.2 Chemische Synthese von phosphorylierten Peptiden & Proteinen	20
2.4 Peptidsynthese und -reinigung ohne HPLC	23
2.4.1 Reinigungsmethoden nach der „Catch & Release“ Methode	24
2.4.2 Selbstreinigende Peptidthioestersynthese.....	25
2.5 Protein und Peptidarrays	26
2.5.1 Oberflächenimmobilisierung von Proteinen und Peptiden.....	28
2.5.2 Synthese von Proteinen und Peptiden auf Arrayoberfläche	32
2.6 Biologischer Hintergrund von Abl, Arg und Bcr-Abl.....	34
3. Kapitel: Zielstellung	39
4. Kapitel: Ergebnisse und Diskussion	41
4.1 Synthese der Hefe-SH3-Domäne von YSC84 auf Ni-NTA funktionalisierten Mikrotiterplatten.....	42
4.1.1 Synthese der YSC84 SH3-Domäne via Cystein-Scan.....	42
4.1.2 Synthese der YSC84-SH3-Domäne mittels Entschwefelung.....	49
4.1.3 Diskussion und Fazit.....	51
4.2 Immobilisierung durch CuAAC für die Oberflächen-Ligation & -Entschwefelung....	52
4.2.1 Peptid-Verankerung auf Azid-funktionalisierten Mikrotiterplatten.....	52
4.2.2 Oberflächen-Ligation und -Entschwefelung	55
4.2.3 Diskussion und Fazit.....	58
4.3 Oberflächensynthese und -analyse von Hefe-SH3-Domänen via Hydrazonligation....	59
4.3.1 Erforschung der Hydrazonligation für die Immobilisierung.....	60
4.3.2 Herstellung und Verwendung Aldehyd-funktionalisierter Mikrotiterplatten	63
4.3.3 Oberflächensynthese der SH3-Domänen von YSC84 und ABP1	65
4.3.4 Analyse der Bindungsaffinitäten von YSC84 und ABP1 SH3-Domänen.....	68
4.3.5 Diskussion und Fazit.....	70

4.4	Verbesserte selbstreinigende Synthese von langen oder aggregierenden Peptidthioestern.....	72
4.4.1	Optimierung der Erstbeladung von Sulfonamid-PEG-Harzen	72
4.4.2	Verbesserte Synthese der Abl- und Arg-Peptidthioester.....	79
4.4.3	Diskussion und Fazit.....	82
4.5	Oberflächensynthese und -analyse humaner phosphorylierter SH3-Domänen.....	83
4.5.1	Oberflächensynthese der (Phospho)SH3-Domänen von Abl- und Arg.....	84
4.5.2	Bindungsmessungen der Phosphoformen der Abl- und Arg-SH3-Domänen an der Oberfläche	86
4.5.3	Diskussion und Fazit.....	90
4.6	Vergleichende Analyse der Abl-(Phospho)SH3-Domänen in Lösung	92
4.6.1	Vergleichende Synthese der Abl-(Phospho)SH3-Domänen in Lösung.....	92
4.6.2	Bindungsmessungen der Abl-(Phospho)SH3-Domänen mittels Fluoreszenzpolarisation in Lösung.....	97
4.6.3	Bindungsmessungen der Abl-(Phospho)SH3-Domänen mit unmarkierten Peptiden in Lösung mittels Tryptophan-Emission	98
4.6.4	Diskussion und Fazit.....	100
4.7	Evaluierung der Abl-(Phospho)SH3-Domänen mittels NMR	102
4.7.1	Strukturelle Charakterisierung der Abl-(Phospho)SH3-Domänen	102
4.7.2	Schmelzverhalten der Abl-(Phospho)SH3-Domänen ermittelt durch ¹ H- NMR Spektroskopie	104
4.7.3	Ligandeninteraktion mit Abl-(Phospho)SH3-Domänen im ¹ H-NMR	108
4.7.4	Diskussion und Fazit.....	110
4.8	Pulldown-Experimente zur Evaluierung der Abl-SH3 Phosphoregulierung	113
4.8.1	Immobilisierung und Bindungsfähigkeit von (Phospho)SH3-Domänen auf Agarose-Kugeln.....	113
4.8.2	Pulldown-Experiment mit K562-Zelllysat.....	116
4.8.3	Diskussion und Fazit.....	122
5.	Kapitel: Zusammenfassung und Ausblick.....	125
5.1	Zusammenfassung	125
5.2	Ausblick	131
6.	Kapitel: Experimenteller Teil	135
6.1	Materialien und Messgeräte.....	135
6.2	Verzeichnis verwendeter Puffer und Waschlösungen	142
6.3	Allgemeine Syntheseprotokolle	143
6.3.1	Manuelle Festphasen-Peptidsynthese.....	143
6.3.2	Automatische Festphasen-Peptidsynthese	144
6.4	Experimentelle Vorschriften zu Unterkapitel 4.1	144
6.4.1	Selbstreinigende Peptidthioestersynthese auf PS-Harz	144

6.4.2	Synthese der His ₆ -Cysteinylopeptiden der Hefe-SH3-Domäne von YSC84	147
6.4.3	Vorgehen zur Quantifizierung von immobilisierten Biotin-tragenden Peptiden mit HRP-SA Analyse.....	148
6.5	Experimentelle Vorschriften zu Unterkapitel 4.2	150
6.5.1	Synthese des Azidothiol-Linkers 99.....	150
6.5.2	HRP-SA-Kalibrierung mit Maleimid-funktionalisierten Platten.....	154
6.6	Experimentelle Vorschriften zu Unterkapitel 4.3	157
6.6.1	Synthese von Peptidhydraziden	157
6.6.2	Analyse der Chemoselektivität der Hydrazonligation mit N-Cysteinyldhydraziden..	159
6.6.3	Untersuchung zur Reversibilität der Hydrazonbindung.....	160
6.6.4	Synthese des Mercapto-polyethylenglycol-acetal-Linkers (141)	160
6.6.5	Herstellung der Aldehyd-funktionalisierten Mikrotiterplatten (143)	162
6.6.6	Hydrazid-Immobilisierung, Oberflächen-NCL und -Entschwefelung	163
6.6.7	Synthese von 5/6-Carboxyfluorescein markierten Peptiden	163
6.6.8	Oberflächen-Fluoreszenzsättigungsanalyse mit SH3-Domänen von Hefe	164
6.6.9	Fluoreszenzpolarisations-Bindungsassay	169
6.7	Experimentelle Vorschriften zu Unterkapitel 4.4	169
6.7.1	Optimierung der Erstbeladung von Sulfonamid-PEG-Harzen	169
6.7.2	Optimierte selbstreinigende Peptidthioestersynthese auf PEG-AM-Harz.....	171
6.8	Experimentelle Vorschriften zu Unterkapitel 4.5	173
6.9	Experimentelle Vorschriften zu Unterkapitel 4.6	175
6.10	Experimentelle Vorschriften zu Unterkapitel 4.7	182
6.11	Experimentelle Vorschriften zu Unterkapitel 4.8	184
6.11.1	Pulldown-Experiment mit K562-Zellysat.....	185
7.	Abkürzungsverzeichnis.....	190
8.	Literaturverzeichnis.....	193
9.	Verbindungsverzeichnis wichtiger Verbindungen	206
10.	Anhang.....	207
10.1	Chromatogramme und Massenspektren von verwendeten Peptiden.....	207
10.2	NMR-Spektren neuer organischer Verbindungen	221
10.3	Bindungsisothermen der Messungen auf der Oberfläche und in Lösung.....	231
10.4	Angereicherte Proteine des Pulldown-Experiments.....	246
	Danksagung	257
	Publikationsverzeichnis.....	259
	Selbstständigkeitserklärung	261

1. Kapitel: Einleitung

Nachdem das *Humane Genome Project* weniger als 21'000 proteinkodierende Gene im Menschen identifiziert und kartiert hatte^[1], war die wissenschaftliche Gemeinschaft schockiert. Denn zum einen waren dies weniger Gene als manche Pflanzenarten haben, wie beispielsweise Mais (32'000).^[2] Zum anderen deckten die Gene nur 1.2% der 3 Milliarden gefundenen Basenpaare ab.^[3] Was ist also dann der Ursprung der biologischen Komplexität des Menschen? Kann eventuell die Zahl und Diversität der humanen Proteine als Maß der Komplexität verwendet werden?

Proteine können im Gegensatz zu DNA nicht vervielfältigt werden und sind chemisch viel heterogener als DNA und RNA. Um diese Herausforderungen in einer gemeinsamen Anstrengung zu begegnen, wurde 2010 das *Human Proteom Project* ins Leben gerufen.^[4] Hierbei sollten alle Proteine der entsprechenden Gene im Menschen gefunden werden und zusätzlich nach posttranslationalen Veränderungen gesucht werden. Rund 85% der unverändert übersetzten Proteine wurden gefunden.^[5] Neben diesen wurden allerdings hunderttausende andere Proteine gefunden, die nicht direkt im menschlichen Genom kodiert vorliegen. Die Menge an Genen kann daher nicht als Maß für die Komplexität eines Organismus herangezogen werden. Denn die Komplexität der aus einem Gen resultierenden Proteinviefalt unterscheidet sich stark zwischen den Spezies. So ist z.B. das alternative Spleißen ein normaler Vorgang bei Eukaryoten.^[6] Im Menschen unterliegen ~95% der multi-exonen Gene dem alternativen Spleißen.^[7] Die Diversität, die sich daraus ergibt, ist unüberschaubar.

Die Proteindiversität erhöht sich weiter nach der Translation. Mit Hilfe von posttranslationalen Modifikationen (PTM) werden Proteine durch vielfältige chemische Modifikation weiter verändert. *Küster et al.* haben nahezu eine Million einzigartige Proteoformen mittels Massenspektrometrie gefunden.^[8] 2011 waren 304 PTMs bekannt, wobei immer wieder neue PTMs entdeckt werden.^[9] Die Phosphorylierung stellt mit 57'191 Einträgen innerhalb der 530'264 Einträge (Stand Juli 2011) in der UniProt Datenbank die häufigste PTM dar.^[9]

Dieser überwältigenden Vielfalt an Proteinen steht eine noch größere Mannigfaltigkeit an Interaktionsmöglichkeiten gegenüber. Eine statischste Herangehensweise berechnete die möglichen Protein-Protein-Interaktionen im Menschen auf ca. 650'000. Das ist eine Größenordnung mehr als bei *Drosophila*. Lediglich weniger als 0.3% dieser vorhergesagten Wechselwirkungen im Menschen waren 2008 identifiziert.^[10] Seitdem hat eine

intensive Forschungsleistung mit exponentiellen Wachstum humane Interaktionen gefunden. 210'000 Einträge wurden 2015 gezählt.^[11]

Dieses rasche Wachstum wurde durch die Protein-Array-Technologie ermöglicht. Die schnelle Analyse ganzer Proteome kann mit Hilfe von Proteinmikroarrays durchgeführt werden. Mit den Techniken, welche ursprünglich für die Herstellung von DNA-Mikroarrays entwickelt worden sind, können tausende Proteine auf einem Chip appliziert werden. Nachfolgend wird eine biologische Probe aufgetragen und bindende Proteine können analysiert werden.^[12] Eine Erforschung des Proteininteraktionsnetzwerkes ist essentiell für das Verstehen von gesunden sowie krankhaften Signalwegen. Es wurde erkannt, dass Proteine, die an vielen Interaktionen teilnehmen, Schlüsselemente und Startpunkte vieler Krankheiten sind.^[11,13]

Rekombinante Methoden können zwar mit großem Aufwand tausende von Proteinen sequenzspezifisch liefern,^[12,14] eine Herstellung von gezielten post-translational modifizierten Proteinen im Hochdurchsatz ist allerdings nicht möglich. Selbst die häufigste PTM – die Phosphorylierung – ist nicht ortsspezifisch realisierbar. Die mangelnde Verfügbarkeit von Kinasen, die quantitativ und regiospezifisch gewünschte Aminosäuren phosphorylieren, verhindert somit eine globale Analyse des Proteininteraktionsnetzwerkes der Phosphorylierung. Eine solche Analyse ist wünschenswert, da Phosphorylierung als Schalter in vielen Signalwegen fungiert, der besonders in Krebszellen häufig beharrlich an- oder ausgeschaltet ist.^[15]

Die chemische Synthese bietet hingegen den gezielten quantitativen Einbau gewünschter PTMs an der Stelle des Interesses. Die geringe Reichweite in der Länge der Peptidkette ist der wesentliche Nachteil chemischer Methoden. Kettenlängen von über 50 Aminosäuren mittels Festphasenpeptidsynthese zeigen häufig schlechte Ausbeuten und nicht lösbare Aufreinigungsprobleme. Eine konvergente Synthesestrategie, bei der zwei oder mehr Peptidfragmente verknüpft werden, löst das Reichweitenproblem. Wünschenswert ist eine Methodik, die es ermöglicht PTM-modifizierte Peptidfragmente in einem Arrayformat zu kombinieren, um immobilisierte PTM-funktionalisierte Proteine zu erhalten und diese anschließend funktionell zu untersuchen.

Die Entwicklung einer solchen Methodik und die Analyse, der mit Ihr erhaltenen Daten, sind Gegenstand dieser Arbeit.

2. Kapitel: Stand der Forschung

Peptide und Proteine sind die vitalen Komponenten jedes Organismus. Sie sind entscheidend für das Überleben und die Funktionsweise jeder einzelnen Zelle. Des Weiteren übernehmen sie vielfältigsten Funktionen in biologischen Systemen: Vom Wirkstoff zum Giftstoff, über Transporter bis hin zum Strukturgeber der Zelle, sind sie das ubiquitäre Multifunktionswerkzeug der Natur.

Proteine funktional auf einer molekularen Ebene zu verstehen, ist das nicht endende Ziel der Lebenswissenschaften. Die erste Bedingung, um eine solche Studie zu beginnen, ist die zu untersuchenden Proteine in ausreichender Reinheit und Quantität zu erhalten. Es gibt drei Vorgehensweisen, um das gewünschte Material zu erhalten: (1.) Die Proteinextraktion aus natürlichen Quellen, (2.) rekombinante Methoden, also die Expression der Proteine in Zellen, und (3.) die chemische Totalsynthese der Proteine.^[16] Jede der drei Methoden hat ihre spezifischen Vor- und Nachteile. Die Proteinextraktion liefert meist nur eine äußerst geringe Menge. Dieses Problem löste die Proteinüberexpression. Dieses molekularbiologische Verfahren sorgte für wissenschaftliche Durchbrüche in der Biologie. Die Methode ermöglichte außerdem Proteintherapeutika, welche die Medizin erheblich bereichert haben. Limitierend ist allerdings die Beschränkung auf die zwanzig genetisch kodierte Aminosäuren (AS). Unnatürliche Aminosäuren oder PTMs können nur vereinzelt und unter sehr großen Anstrengungen in Proteine eingebaut werden. In der Länge scheint es kaum Einschränkungen zu geben. Allerdings lassen sich nicht alle gewünschten Proteine und diese nicht in beliebigen Mengen exprimieren. Zum Beispiel stellt die Expression von Transmembranproteinen häufig ein Problem dar.

Die chemische Synthese hingegen ermöglicht einen mannigfaltigen Einbau von z.B.: atomspezifischen Isotopenmarkierungen, Fluorophoren, unnatürlichen Aminosäuren und D-Aminosäuren. Sie bietet in der Regel den verlässlichen Erhalt einer großen Peptidmenge. Außerdem lassen sich theoretisch alle PTMs sequenzspezifisch einbauen. Die chemische Synthese hat aber eine Achillesferse; die erreichbaren Längen der Proteine.

2.1 Die chemische Peptidsynthese – Stetige Erweiterung der Kettenlängen

Seit dem Beginn der chemischen Peptidsynthese (Dipeptide), der um die letzte Jahrhundertwende begann, sind die momentan erreichbaren Längen bei über 300 Aminosäuren angekommen.^[17] Der gegenwärtige Rekord wird von der Arbeitsgruppe *Brik* mit

der Synthese des 334 Aminosäuren langen Tetraubiquitins gehalten.^[17c] Die folgende historische Übersicht beschränkt sich auf wenige Höhepunkte in der Geschichte der chemischen Peptidsynthese im Kontext dieser Arbeit und hat keinen Anspruch auf Vollständigkeit.

In der wissenschaftlichen Literatur wird häufig die Hydrolyse des Diketopiperazin von Glycin im Jahr 1901 zum Diglycin^[18] oder die direkte Amidknüpfung mittels des Säurehalogenids des Glycin von 1903^[19] durch *Fischer et al.* als Beginn der Peptidchemie bezeichnet. Sinnvoller erscheint allerdings die 19 Jahre ältere Synthese von *Curtius* als Beginn der Peptidchemie anzusehen. 1882 wurde das erste *N*-geschützte Dipeptid (Benzoylglycylglycin) durch Behandlung des Silbersalzes von Glycin mit Benzoylchlorid synthetisiert.^[20]

Nach vielen Erfolgen der Peptidsynthese in Lösung^[16] (z.B. die Oxytocin-Synthese 1953 durch *du Vigneaud et al.*, Nobelpreis 1955)^[21] war ein entscheidender weiterer Meilenstein die Entwicklung der Festphasenpeptidsynthese (engl. *solid phase peptide synthesis*, Abk. SPPS) durch *Merrifield* 1963 (Nobelpreis 1984).^[22] Die Durchführung der Peptidsynthese wurde dadurch deutlich vereinfacht und ermöglichte demgemäß längere Peptide. Ein weiterer Meilenstein war die Kombination der Flüssigchromatographie (engl. *liquid chromatography*, Abk. LC) mit der Massenspektrometrie (MS) 1968.^[23] Welche letztendlich zur Verknüpfung der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (engl. *high pressure liquid chromatography*, Abk. HPLC) mit der Elektrosprayionisation (ESI) geführt hat (Nobelpreis 2002).^[24] Die HPLC und die stetige Verbesserung derselben, seit der ersten Publikation im Jahr 1971, stellt ebenfalls ein Meilenstein dar.^[25] Die HPLC-ESI(MS) ermöglichte die Analyse der Substanzgemische, die typischerweise bei der SPPS anfallen. Durch die präparative HPLC konnten diese dann getrennt werden. Chemisch synthetische Meilensteine waren außerdem die Erfindung der temporären *N*-terminalen Aminosäure-Schutzgruppen *tert*-Butyloxycarbonyl (Boc) 1957^[26] und der dazu orthogonalen Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) Schutzgruppe 1970^[27] durch *Carpino et al.* Obwohl einige kleine Proteine durch die rein lineare SPPS dargestellt worden sind, war die lineare Synthese größerer Proteine häufig schwierig oder unmöglich. Das kann zum einen mit der intrinsisch geringen Ausbeute der linearen Synthese erklärt werden. Die Gesamtausbeute ist das Produkt der einzelnen Kupplungsausbeuten. So ist die Gesamtausbeute bei 100 Kupplungen, bei einer jeweiligen Effizienz von 95%, lediglich 0.6%. Zum anderen wird Ausbeuteverlust häufig durch Aggregation während der Elongation der Peptidkette erklärt. Die Tendenz zur Aggregation ist stark sequenzabhängig. So sind Peptide, die reich an β -Faltblattstrukturen

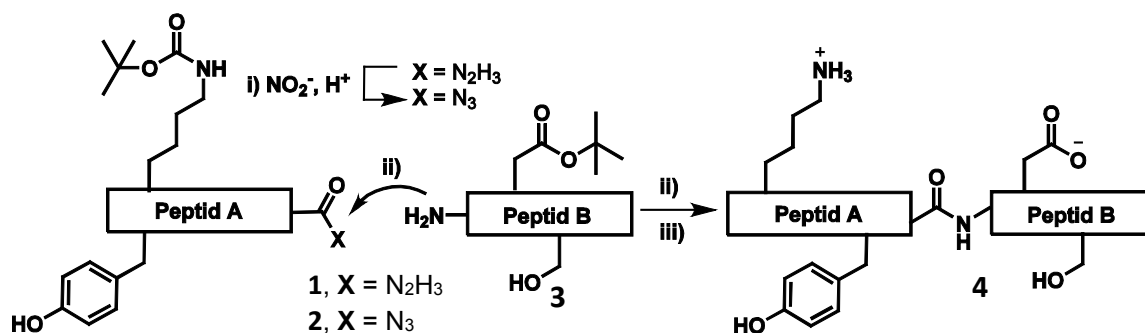
sind und auch im nativen Zustand einen Hang zur Aggregation haben (z.B. β -Amyloid), meist sehr schwer zu synthetisieren.^[28] Um der Aggregation während des Kettenwachstums durch hydrophobe Wechselwirkung oder Wasserstoffbrücken des Amidrückrades entgegenzuwirken, wurden viele Zusätze erprobt. Dazu zählen der Einsatz von Dimethylsulfoxid (DMSO)^[29], *magic mixture*^[30] sowie die Zugabe chaotroper Salze^[31]. Eine große Verbesserung wurde durch die Veränderung des polymeren Trägers erreicht. Die Verwendung von Polyethylenglycol (PEG) minimiert durch seinen amphiphilen Charakter die Aggregation. Diese Idee hat zunächst zu Polystyrol-PEG-Kopolymeren geführt, wie z.B. Tentagel^[32]. Später wurden ausschließlich PEG-basierte Harzsysteme hervorgebracht, wie *superpermeable organic combinatorial chemistry resin* (SPOCC)^[33] und ChemMatrix (CM)^[34]. PEG-basierte Harze ermöglichten die Synthese von β -Amyloid in einer Reinheit des Rohprodukts von 91%. Die 99 Aminosäuren lange HIV-Protease wurde auf PEG-Harz linear synthetisiert.^[35] Eine weitere Möglichkeit längere Peptide herzustellen ist die Verwendung der Mikrowellenstrahlung.^[36] Die erhöhten Temperaturen zwischen 50-80°C sorgen für schnelle Reaktionszeiten und Kupplungs- ausbeuten. Mit Hilfe eines Mikrowellen-Synthesizers wurde beispielsweise das 109 Aminosäuren lange humane Exon 1 Huntingtin Peptid synthetisiert.^[37]

Zur Reduzierung des Aggregationspotentials des wachsenden Peptids ist es hilfreich, Amide temporär zu schützen, um durch die Substitution des Amidprotons die Aggregation über Wasserstoffbrückenbindungen zu stören. *Sheppard et al.* haben dafür 1993 die *N*-(-2-Hydroxy-4-methoxybenzyl) (Hmb) Gruppe entwickelt.^[38] Es wurde festgestellt, dass der Einbau von L-Pro Aggregation entgegenwirkt.^[39] Pseudoproline (ψ Pro), die 1992 von *Mutter et al.* entwickelt wurden, erfüllen diesen Zweck ebenso. Sie erzeugen durch die *cis*-Amidbindung einen „Knick“ in der Peptidkette. Der Knick beugt der Entstehung von β -Faltblatt und α -Helixstrukturen vor.^[40] ψ Pro wurden erst als oxazolidine-geschützte Aminosäurebausteine verwendet. Die nachfolgende Kupplung lieferte allerdings nur sehr geringe Ausbeuten. Daher werden sie heutzutage kommerziell als Dipeptide verwendet, wobei die C-terminale Aminosäure ein Serin, Threonin, oder Cystein ist.^[41] Eine weitere Möglichkeit die synthetischen Ausbeuten zu verbessern sind *O*-Acyl-Isopeptide. Diese Dipeptide bestehen aus einem *N*-Boc-geschützten Ser- oder Thr-Rest, wobei die Hydroxylgruppe durch eine Fmoc-Aminosäure acyliert ist. Nach Einbau des Dipeptids weist das so gebildete Depsipeptid einen Knick auf (ähnlich der Pseudoproline) dieser bleibt auch nach Behandlung mit TFA bestehen. Der Knick und die zusätzliche Aminogruppe sorgt für eine verbesserte Löslichkeit, was die HPLC Reinigung vereinfacht. Eine Anpassung des pH-Werts auf > 8 führt zu einem O \rightarrow N

Acytransfer und somit zum Erhalt des nativen Peptids. Die Technik wurde von *Sohma et al.* mit einer Veresterung auf dem Synthescharz vorgestellt^[42] und durch die Arbeitsgruppe von *Kiso* durch die Kupplung von *O*-Acyl-Isopeptid-Dipeptiden etabliert^[43].

2.2 Konvergente chemische Totalsynthese von Proteinen

Trotz der herausragenden Verbesserungen in der linearen Peptidsynthese waren die erreichbaren Kettenlängen häufig noch zu gering, um funktionelle Proteine totalsynthetisch zu generieren. Auch wenn die Proteinelängen teilweise erreicht wurden, waren die Ausbeuten zu gering oder die Aufreinigungsprobleme zu herausfordernd. Die Auswirkung der Multiplikation der Einzelausbeuten (z.B. 95%) auf die Gesamtausbeute wurde bereits diskutiert. Wird ein 100 Aminosäuren langes Peptid hingegen aus zwei 50-mer Fragmenten konvergent aufgebaut beträgt die Gesamtausbeute 8% (bei quantitative Fragmentverknüpfung), statt 0.6% bei linearer Synthese. Daher war die Etablierung einer konvergenten Peptidsynthese ein kontinuierliches Ziel, welches parallel zur Optimierung der linearen Synthese betrieben wurde.



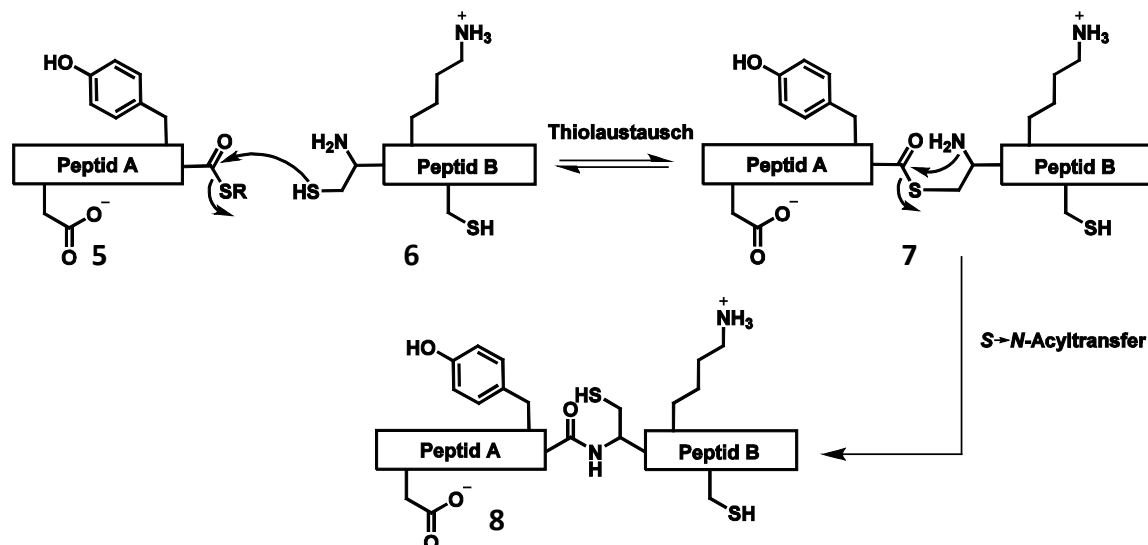
Schema 2.1: Peptidfragmentverknüpfung nach Curtius. i) Aus dem Peptidhydrazid **1** wird das Peptidazid unter sauren Bedingungen mittels Nitrit generiert. ii) Das Azid wird vom *N*-Terminus des Fragments **3** nukleophil angegriffen und somit werden beide Fragmente verknüpft. iii) Anschließend werden alle Schutzgruppen entfernt und das gewünschte Verknüpfungsprodukt **4** erhalten.

Die ersten konvergenten Totalsynthesen von Proteinen basierten auf Fragmentverknüpfungen von geschützten oder teilgeschützten Peptidfragmenten. Dies wurde zunächst durch die Verwendung von Peptidsäurechloriden nach *Fischer*^[19] erreicht, dann aber vermehrt mittels Peptidaziden nach *Curtius*^[44]. Der Vorteil der Azidmethode, die durch *Rudinger et al.* 1961^[45] sowie durch *Alfeeva* und anderen 1995^[46] verbessert wurde, ist die geringe Tendenz zur Oxazol-5(4H)-on-Bildung, wodurch die Racemisierung minimiert wird. Hierbei werden zuerst *C*-terminale Peptidhydrazide **1** in Peptidazide **2** überführt (Schema 2.1). Das Azid **2** unterliegt Aminolyse der *N*- α -Aminofunktion des Peptidfragments **3**. Die Peptidfragmente müssen teilgeschützt eingesetzt werden, da Amino- und Carbonsäurefunktionen die Reaktionsfolge stören. Mit dieser Methode

konnten einige Proteine erfolgreich synthetisiert werden, z.B. die Ribonuklease A^[47] und iso-1-cytochrome c^[48]. Ein Nachteil dieser Methode ist jedoch, dass sie in relativ hohen Konzentrationen durchgeführt werden muss (~50 mM), in der sich die Fragmente auf Grund der nötigen Schutzgruppen nur schwer lösen. Ebenso zählen geringe Ausbeuten und langsame Reaktionszeiten (~20 h) zu den spezifischen Problemen.

2.2.1 Die Natürliche Chemische Ligation (NCL) ungeschützter Peptide

Die chemoselektive Verknüpfung von ungeschützten Peptiden in Wasser wurde 1992 von der Arbeitsgruppe *Kent* vorgestellt.^[49] Dabei wurde ein 50 Aminosäuren langes *N*-terminales Fragment der *HIV-1 Protease* als Thiosäure mit einem Bromoacetyl modifizierten *C*-terminalen Fragment (46-mer) innerhalb von 3 h in Wasser umgesetzt. Obwohl die native Gly-Gly Bindung durch einen Thioessigsäurerest (Gly-S-CH₂-CO) ersetzt wurde, zeigte die Protease die gewünschte enzymatische Aktivität. Diese Verknüpfungsreaktion löste viele Probleme: es konnten ungeschützte Peptide eingesetzt werden, die benötigten Konzentrationen verringerten sich um eine Größenordnung (~4 mM) und die Reaktion konnten in wässrigen Puffersystemen durchgeführt werden. Dennoch hatte die Methode die Nachteile, dass keine nativen Verknüpfungsstellen erhalten werden und keine Sequenzen mit Cysteinresten verwendet werden können.



Schema 2.2: Prinzip der nativen chemischen Ligation (NCL). In dem ersten Schritt findet ein reversibler Thiolaustausch zwischen dem C-terminalen Peptidthioester **5** und dem N-terminalen Cystein des Peptids **6** statt. Nachfolgend greift die Aminofunktion des Cysteins den internen Thioester im Intermediat **7** an. Dieser S→N Acyltransfer liefert das gewünschte Ligrationsprodukt **8** mit einer natürlichen Amidbindung.

Wieland et al. stellten 1953 die chemoselektive Verknüpfung von Aminosäure-Thioestern mit Cystein zu Dipeptiden vor.^[50] Von *Dawson et al.* wurde das Konzept auf ungeschützte Peptide übertragen und native chemische Ligation (engl. *native chemical*

ligation Abk. NCL) genannt.^[51] Die NCL stellte einen wahren Durchbruch in der chemischen Proteinsynthese dar. Diese Verknüpfung von *C*-terminalen α -Peptidthioestern **5** und *N*-terminalen Cysteinylpeptiden **6** ist schnell, verlässlich, chemoselektiv, lässt sich in Wasser durchführen und ermöglicht hohe Ausbeuten (Schema 2.2).

Die Reaktion der beiden Peptidfragmente besteht aus zwei Schritten. Zuerst findet durch den Angriff der Thiofunktion des Cysteinylrestes des *C*-terminalen Fragments **6** an dem Thioester **5** ein reversibler Thiolaustausch statt. Das Intermediat **7** unterliegt einem schnellen intramolekularen S \rightarrow N Acyltransfer, der über einen fünfgliedrigen Übergangszustand verläuft und das Ligationsprodukt **8** sowie eine native Amidbindung liefert.

Die Methode ist zwar theoretisch allgemein anwendbar, doch gibt es große Unterschiede auf Grund der adressierten Verknüpfungsstelle. Die Geschwindigkeit der Reaktion wird hauptsächlich über die sterischen und elektronischen Eigenschaften der Aminosäure, welche den α -Thioester bildet, bestimmt.^[52] Während *C*-terminale Histidin-, Glycin- sowie Cysteinbenzylthioester die schnellsten (< 4h) Aminosäuren für die NCL darstellen und quantitativen Umsatz liefern, zeigen β -verzweigte Aminosäuren und Prolin selbst nach zwei Tagen keine vollständige Reaktion. Darüber hinaus sind Aspartat- und Glutamatreste anfällig für eine intramolekulare Anhydridbildung. Die Öffnung dieses Anhydrids im Zuge der NCL führt zu einem Produktgemisch bestehend aus nativer α -Amid- sowie ungewünschter β - oder γ -Amidverknüpfung bei Asparaginsäure oder Glutaminsäure.^[53] Entscheidenden Einfluss auf die Geschwindigkeit nimmt auch der organische Rest an der Thiol Komponente des Thioesters. Arylthioester reagieren deutlich schneller als Alkylthioester. Somit korreliert die Reaktionsgeschwindigkeit mit den Fluchtgruppeneigenschaften des während des Thiolaustausches austretenden Thiols.^[54] Aufgrund der höheren Stabilität im Rahmen der Synthese und bei der Lagerung werden dennoch häufig Alkylthioester synthetisiert, die während einer NCL durch Zusatz von Thiolen zu reaktiveren Thioestern umgesetzt werden können.

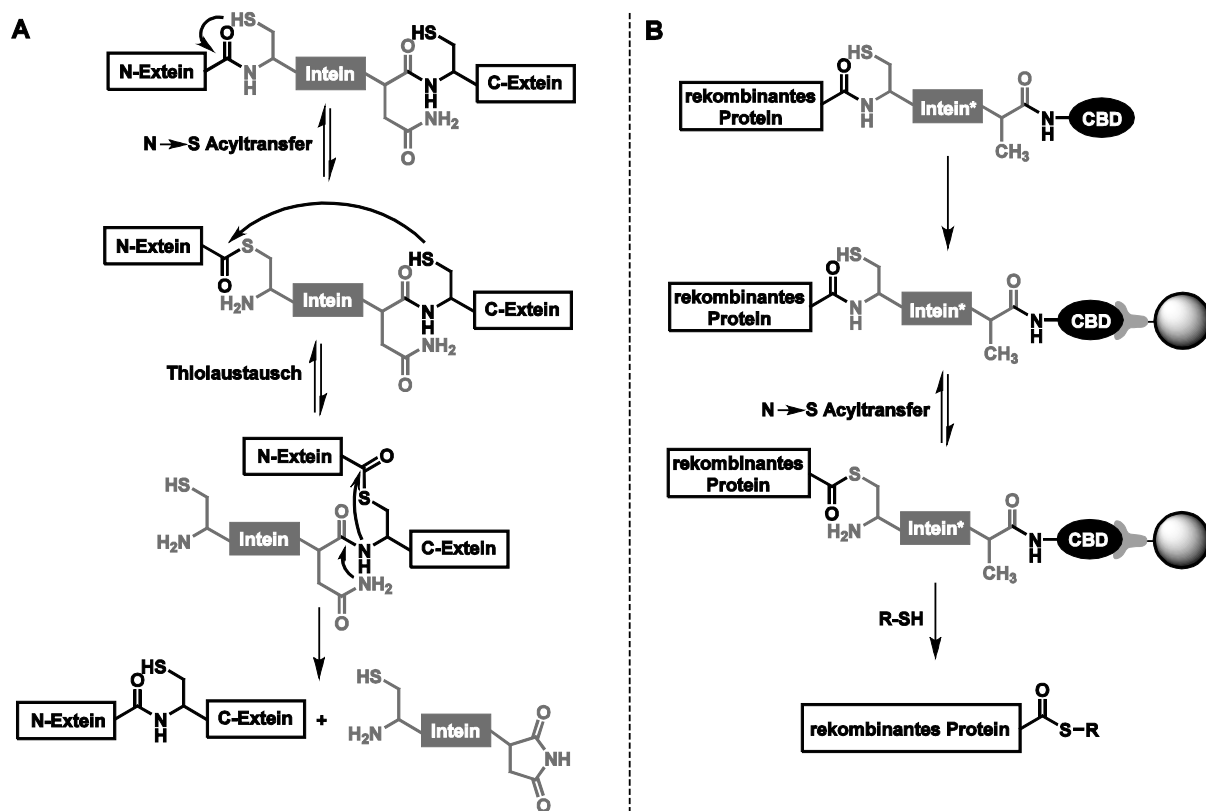
Neben den vielen Vorzügen der NCL wird sie allerdings durch zwei Limitationen beschränkt. Eine Limitation ist die geringe natürliche Häufigkeit von Cystein in Proteinen (1.3%)^[55]. Dies führte zu Methoden, die auch andere Verknüpfungsstellen ermöglichen (Abschnitt 2.2.3, Seite 10). Die zweite Limitation ist die die relativ schwierige Synthese und Handhabung von Peptidthioestern (Abschnitt 2.2.4, Seite 13).

2.2.2 Die Expressed Protein Ligation (EPL)

Die Reichweite der NCL kann erhöht werden, indem chemisch synthetisierte Peptide mit rekombinanten Fragmenten zur Reaktion gebracht werden. Zum einen werden SPPS Peptidthioester mit rekombinanten *N*-terminalen Cysteiny-Peptidfragmenten kondensiert. Dieses Verfahren wurde erstmals 1996 von der Arbeitsgruppe *Verdine* veröffentlicht.^[56] Zum anderen können exprimierte Peptidthioester generiert werden und mit synthetischen Cysteiny-peptiden zur Reaktion gebracht werden. Dies wurde im Jahr 1998 von den Gruppen *Muir* und *Xu* unabhängig beschrieben und *expressed protein ligation* (EPL)^[57] sowie *intein-mediated expressed protein ligation* (IPL)^[58] genannt.

N-terminierte Cysteinproteine sind in der zellulären Umgebung sehr anfällig für Nebenreaktionen (z.B. Thiazolidinbildung durch Aldehyde). Daher werden sie üblicherweise mit einer Proteasespaltungsstelle (*Xa*^[56] oder *TEV*^[59]) oder einer Met-Cys Sequenz exprimiert, die durch Bromcyan gebrochen werden kann, um nach dem Zellaufschluss das Cysteinprotein zu erhalten. Trotzdem ist die Handhabung relativ komplex, weshalb sich die in Schema 2.3 dargestellte Herstellung von rekombinanten Polypeptidthioester nach der EPL als hauptsächlich genutzte Methode durchgesetzt hat.

Rekombinante α -Peptidthioester können durch die Verwendung veränderter Inteine erhalten werden.^[57,60] Inteine sind selbst-prozessierende Domänen, die den natürlich vorkommenden Prozess des Proteinspleißens vermitteln (Schema 2.3 A).^[61] In diesem post-translationalen mehrstufigen Prozess wird ein Peptidfragment (Intein) aus der Vorläufersequenz herausgeschnitten, wobei zwei *N*- und *C*-terminal flankierende Proteinfragmente (*N*- und *C*-Extein) zu einem Protein fusioniert werden. Das gegenwärtige Verständnis des Mechanismus ist in Schema 2.3 A dargestellt.^[62] Der erste Schritt beinhaltet einen *N*→*S* oder *N*→*O* Acylshift, wobei das *N*-Extein auf die Thiol- oder Alkoholgruppe des ersten Inteinrestes transferiert wird. Anschließend erfolgt eine Umesterung auf einen zweiten konservierten Cys, Ser oder Thr-Rest, der sich auf dem *C*-Extein befindet. Die Peptidbindung zwischen Intein und *C*-Extein wird durch den Angriff der Amidseitenkette, der konservierten Asn-Aminosäure am Ende des Inteins gebrochen, wobei ein Succinimid gebildet wird. Der somit freie *N*-Terminus des *C*-Exteins unterliegt einem *S/O*→*N* Acyltransfer analog der NCL, dabei werden *N*-Extein und *C*-Extein verknüpft. Um dieses Prinzip synthetisch nutzen zu können, wurde die Methode entwickelt, welche in Schema 2.3 B dargestellt ist. Die Mutation des Asn-Rests zu Ala blockiert den Spleiß-Prozess und erhält dauerhaft den α -Thioester. Dieser kann durch Thiolzugabe vom Intein durch Thiolaustausch getrennt werden. Mehrere



Schema 2.3: A: Der vorgeschlagene Mechanismus des kanonischen Cystein-Intein gesteuerten Proteinspleißens.^[62]
B: Expression und Reinigung eines rekombinanten Polypeptidthioesters durch ein modifiziertes Intein*-CBD-Fusionsprotein (CBD, *chitin binding domain*). In diesem ist der letzte Asn-rest durch Ala ausgetauscht, womit ein S → N Acyltransfer verhindert wird. Dadurch wird der Thioester erhalten und kann von den Chitin-kugeln mit Thiol chemisch eluiert werden.^[63]

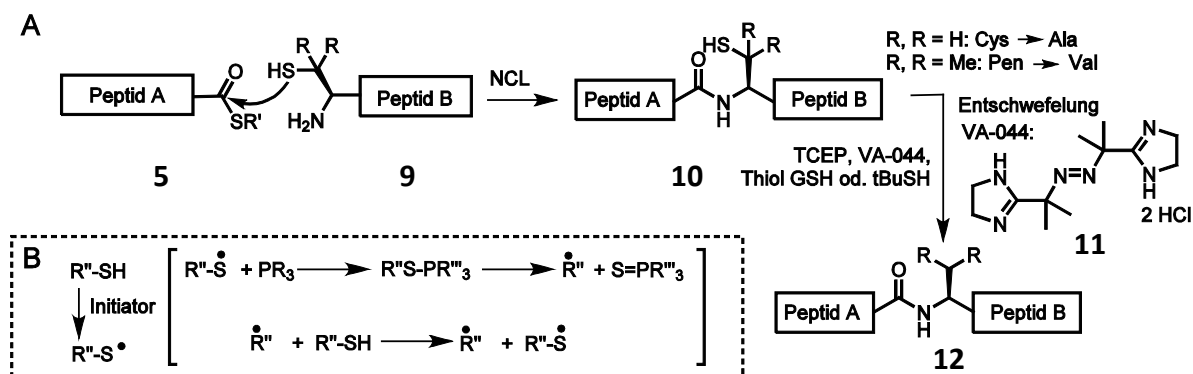
Inteine werden verwendet und sind kommerziell als *E. Coli* Expressionsvektoren erhältlich. Das am meisten benutzte Intein ist das Mykobakterium *xenopy DNA gyrase* (Mce GyrA) Intein. Das Intein wird C-terminal mit einer Affinitätssequenz versehen, die im *IMPACT*-Verfahren eine Chitinbindungs-Domäne (CBD) darstellt. So kann das Fusionsprotein erst auf Chitin-Sphären immobilisiert werden und anschließend wird der autokatalytische N → S Acyltransfer ausgenutzt. Danach kann das rekombinante Polypeptid als Thioester durch ein geeignetes Thiol von der Säule eluiert werden.

2.2.3 NCL an cysteinfreien Verknüpfungsstellen

Um die Limitation der geringen natürlichen Häufigkeit eines Cysteinrestes (1.3%)^[55] an der Verknüpfungsstelle zu umgehen, wurden verschiedene Strategie erdacht.

Theoretisch ist eine direkte Aminolyse analog der Azidmethode (Schema 2.1) eines Peptidthioester durch ein N-terminal ungeschütztes Peptidfragment B möglich. Um praktikable Reaktionszeiten zu gewährleisten, sind aber hohe Peptidkonzentrationen (20-40 mM), ein basischer pH-Wert (> 8) und erhöhte Temperaturen (37°C) notwendig. Außerdem müssen Lysinseitenketten geschützt werden.^[64] Die eleganteren Methoden,

die eine cysteinfreie Ligation ermöglichen, werden unter dem Begriff „erweiterte NCL“ zusammengefasst. Gemeint sind dabei Ligationen mit Hilfe von Auxiliaren oder Entschwefelungsmethoden.

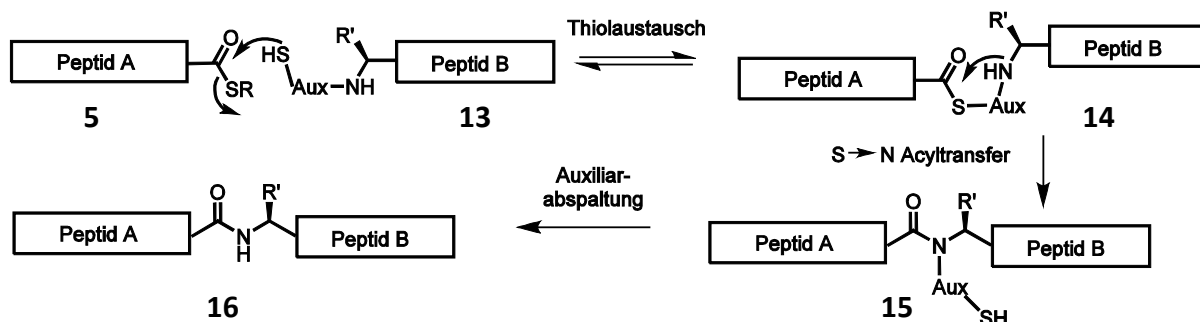


Schema 2.4: **A:** Cystein und Penicillamin (Pen) vermittelte Ligation mit anschließender metallfreier radikalbasierter Entschwefelung. **B:** Mechanismus der radikalinduzierten Entschwefelung mittels TCEP. ^[65]

Eine geschickte Möglichkeit um cysteinfreie Ligationsstellen herzustellen ist die Entschwefelungsstrategie, die in der Arbeitsgruppe von *Dawson* entwickelt wurde und die Reichweite der möglichen Verknüpfungspunkte signifikant erhöhte.^[66] Diese Strategie wurde zuerst für Verknüpfungstellen mit Alanin beschrieben, wobei Cystein als temporäres Surrogat für Alanin fungiert. Nach der NCL wird Cystein in einem Entschwefelungsschritt zu Alanin umwandelt (Schema 2.4, R = H). Dieses Konzept wurde bis heute auf elf verschiedene Aminosäuren erweitert. Die essentielle Thiofunktion wurde dabei auf das β , γ , δ -Kohlenstoffatom ausgedehnt (β : Phe^[67], Val^[65b], Arg^[68], Leu^[69], Asp^[70]; γ : Val^[71], Lys^[72], Thr^[73], Gln^[74], Glu^[75], Pro^[76], Trp^[77]; δ : Lys^[78]).^[79] Mit Ausnahme von γ -Thioprolin und Penicillamin (Pen) sind keine der aufgeführten Thioaminosäuren kommerziell erhältlich, sie benötigen fast ausschließlich mehrstufige Synthesen (acht dieser Bausteine benötigen über 50 synthetische Schritte).^[80] Unterschiedliche Entschwefelungsmethoden wurden vorgestellt. Allerdings hat die metallfreie radikalbasierte Technik von *Danishesky et al.* auf Grund ihrer einfachen Handhabung/Aufreinigung die weiteste Verbreitung gefunden.^[65a] Eintopfreaktionen von Ligation und Entschwefelung sind möglich, was die intermediäre Reinigung des Ligationsprodukts vermeidet.^[81]

Die Verwendung von Penicillamin als Vorläufer von Valin, ist neben Cystein der nützlichste Thioaminosäure-Baustein, da dieser in vielen Variationen als SPPS Bausteine kommerziell erhältlich ist. Die generelle Anwendbarkeit wird dadurch deutlich vereinfacht. Die Verwendung wurde 2008 von *Haase et al.* vorgestellt (Schema 2.4, R = Me).^[65b] Dabei wird ein *N*-terminales Cysteiny- oder Penicillamin-Fragment **9** mit einem α -Peptidthioester **5** zu dem Ligationsprodukt **10** umgesetzt. Radikalische Ent-

schwefelung mittels Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP), 2,2'-Azobis[2-(2-imidazolin-2-yl)propan]dihydrochlorid (VA-044) **11** und Glutathion^[65a] (GSH) oder *tert*-Butylmercaptan^[65b] (*t*BuSH) liefert das Alanin- oder Valinligationsprodukt **12** entsprechend des Mechanismus in Schema 2.4 B. Die Erweiterung der somit erreichbaren Ligationsstellen um Ala und Val erhöht die Häufigkeit adressierbarer Ligationsstellen auf rund 15%.^[55]

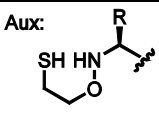
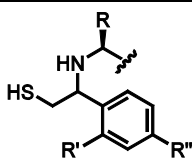
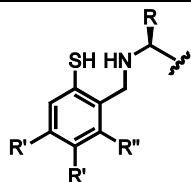
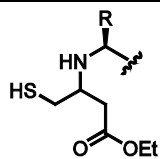
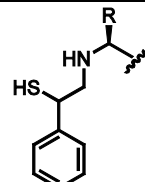


Schema 2.5: Auxiliar (Aux) vermittelte NCL an cysteinfreien Verknüpfungsstellen.

Eine weitere Möglichkeit um cysteinfreie Ligationsstellen zu realisieren ist die Auxiliar-vermittelte NCL, die mittlerweile auf fast alle Aminosäuren erweitert wurde. Am *N*-Terminus des Peptidfragments **13** befindet sich dabei ein thiolhaltiges Auxiliar (Schema 2.5). Das Thiol des Auxiliars greift den Peptidthioester **5** an. Diesem Thiolaustausch folgt ein intramolekularer S → N Acyltransfer, der über einen fünf oder sechsgliedrigen Übergangszustand **14** verläuft. Ausgehend vom Ligationsprodukt **15** folgt anschließend die Auxiliarabspaltung, wobei das Auxiliar-freie Ligationsprodukt **16** erhalten wird. Eine Auflistung wichtiger Auxiliare ist Tabelle 2.1 zu entnehmen. Die ersten Auxiliare ließen sich nicht abspalten und somit konnten keine nativen Proteine **16** erhalten werden (z.B. das Ethylthiolauxiliar^[82] sowie das Phenylethylthiolauxiliar **18** ($R', R'' = H$)^[83]). Das Oxyethylthiol **17** ließ sich mit Zink spalten und lieferte das erste native Peptid über eine Auxiliar-vermittelte Ligation.^[82] Daraufhin wurden vor allem säurelabile Auxiliare entwickelt, die durch erhöhte Elektronendichte im aromatischen System bis zu einer TFA-Labilität optimiert wurden. Die Wahl der Ligationsstellen war sterisch in der Art begrenzt, dass entweder ein Glycin Peptidthioester **5** oder ein *N*-terminales Glycin im Auxiliarpeptid **13** nötig war, um praktikable Reaktionszeiten und Ausbeuten zu erhalten. Von *Loibl* und *Seitz* wurde 2015 ein 2-Mercapto-phenethyl Auxiliar **21** vorgestellt, dass sich mittels TCEP und aminischen Basen, vermutlich über einen radikalischen Mechanismus, abspalten lässt. Es gibt zwei Besonderheiten bei diesem Auxiliar. Zum einen kann die Aldehydvorstufe mittels reduktiver Aminierung auf jede Aminosäure einfach auf der festen Phase aufgebracht werden. Zum anderen lassen

sich Ligationsstellen jenseits der Glycin-Limitation realisieren. Selbst die sehr anspruchsvolle Leu-Arg-Ligation konnte mit einer Ausbeute von 77% erzielt werden.

Tabelle 2.1: Übersicht über die unterschiedlichen Auxiliarsysteme.

Auxiliar:	Oxyethylthiol	Phenylethylthio	Mercaptobenzyl-amin	Mercapto-butyrat	2-Mercapto-phenethyl
Struktur:					
Nr.:	17	18	19	20	21
Verknüpfungsstellen:	Gly-Gly Ala-Gly Phe-Gly Gly-Ala	Gly-Gly Ala-Gly His-Gly Lys-Gly	Gly-Gly Ala-Gly Phe-Gly Gly-Ala Gly-Gln	Gly-Gly Ala-Gly Gly-Ala	Gly-Gly, Leu-Gly, Gly-Gln, His-Asp, Leu-Arg, Phe-Met, Ala-Asn, Ser-Glu
Abspaltungsbedingung:	Zn/ AcOH	R', R'' = H: -- R' = H; R'' = OMe: HF oder TMSBr R', R'' = OMe: TFA	R', R'' = H: -- R' = H; R'' = OMe: HF oder TMSBr R', R'' = OMe: TFA	TCEP, Aminbase	TCEP, Aminbase
Referenz:	[82]	[83-84]	[85]	[86]	[87]

Die Aufbringung mittels Reduktiver-Aminierung ist auch mit dem Auxiliar **20** von *Harpaz et al.* über ein Keton möglich.^[86]

2.2.4 Synthese von Peptidthioestern nach der Fmoc/*t*Bu-Strategie

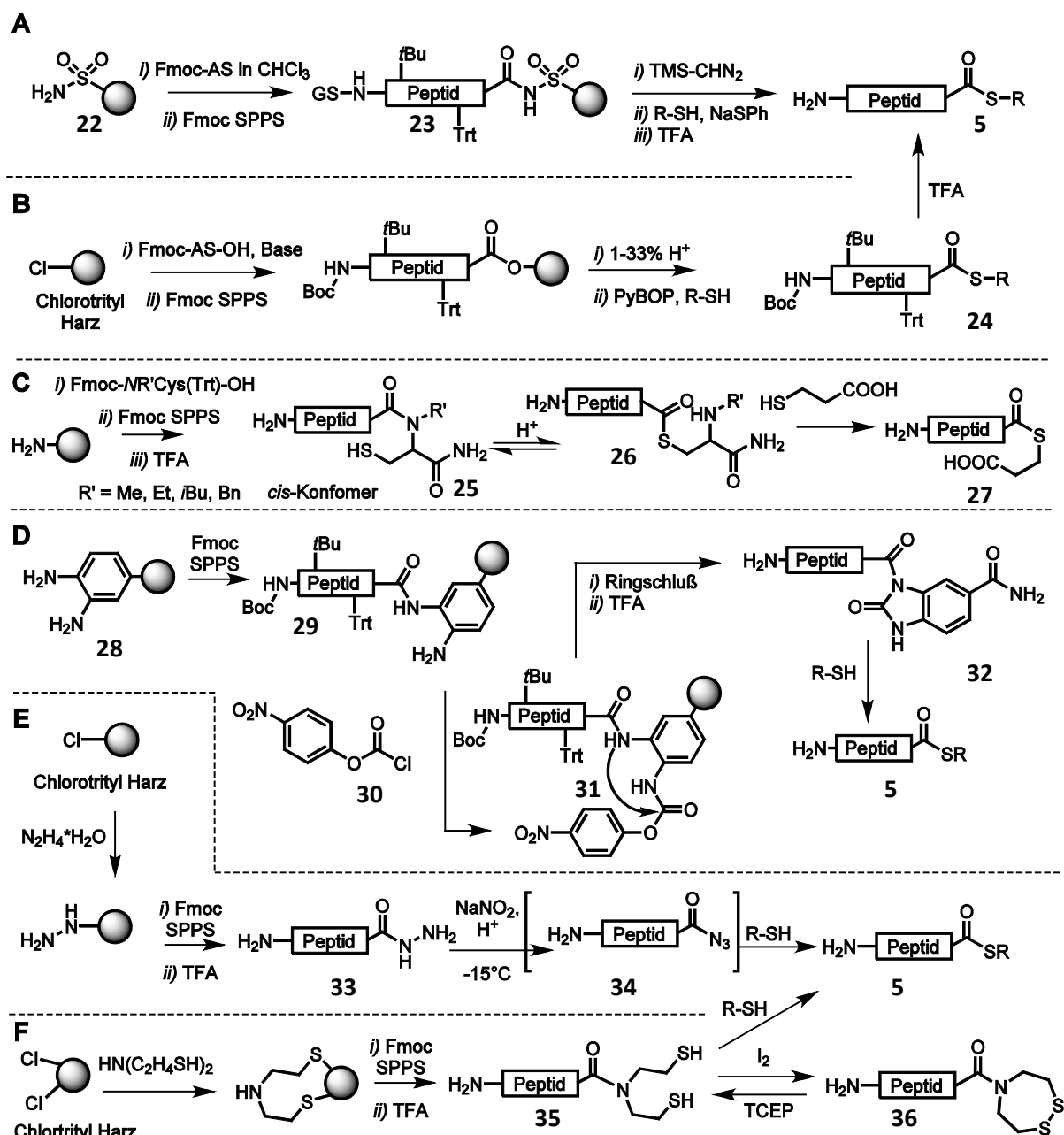
Die NCL stellt, wie in Abschnitt 2.2 aufgeführt, eine der leistungsfähigsten chemischen Methoden zur Totalsynthese von Proteinen und Polypeptiden dar. Sie bedarf ungeschützter α -Peptidthioester, welche im Gegensatz zu den Cysteinyl-Fragmenten keine nativen Peptide sind.

Da Peptide nach *Merrifield* am polymeren Träger vom *C*- zum *N*-Terminus aufgebaut werden, muss ein Thioester oder eine Thioestervorstufe gegenüber allen chemischen Bedingungen während der *n*-1 Kupplungen eines *n* Aminosäuren langen Peptids beständig sein. Traditionell beginnt die Peptidthioestersynthese mit der Veresterung der ersten *C*-terminalen Aminosäure mit einer thiolmodifizierten festen Phase. Somit liegt die erste Aminosäure während der gesamten Synthese als Thioester vor.^[88] Daher wird die klassische Peptidthioestersynthese nach der Boc/Bzl-Schutzgruppenstrategie durchgeführt. Neben dem Vorteil der generell leicht erhöhten Kupplungsausbeuten, sind

die Nachteile der Methode dem wiederholten Einsatz von Trifluoressigsäure (TFA) zur Abspaltung der Boc-Schutzgruppe sowie der Notwendigkeit starker Säuren wie HF für die finale Abspaltung geschuldet. Die Synthese säurelabiler Peptide ist demnach schwer möglich. So können z.B. glykosilierte Peptide, die *O*-glykosidische Bindungen aufweisen, nach der Boc-Strategie kaum hergestellt werden. Eine weitere Einschränkung ist die korrosionsfördernde Eigenschaft der TFA, die eine Verwendung in parallelen Peptidsyntheseautomaten ausschließt. Eine parallele Synthese im Hochdurchsatz ist aber beispielsweise für die Herstellung von Proteinarrays von Nöten (Abschnitt 2.5.2).

Aus diesem Grund wird in parallelen Peptidsyntheseautomaten die SPPS nach der Fmoc/*t*Bu Strategie durchgeführt. Hier wird die Fmoc-Schutzgruppe mit einer nukleophilen Base vor jedem Kupplungsschritt entfernt. Einer Peptidthioestersynthese steht aber die Verwendung der Base im Weg, da der Thioester gegenüber den benötigten nukleophilen Basen (z.B. Piperidin) nicht stabil ist. Es wurden einige Strategien erdacht, um den Peptidthioester erst am Ende der Synthese aus einem Thioestervorläufer zu generieren. Die praktikabelsten und somit am häufigsten verwendeten Methoden sind in Schema 2.6 illustriert.

Ingentio et al. haben eine Methodik^[89] entwickelt, welche auf dem von *Kenner et al.*^[90] vorgestellten und von *Backes* und *Ellman*^[91] verbesserten „*safty-catch linker*“ **22**, basiert (Schema 2.6 A). Demnach wird das Peptid nach der Fmoc-SPPS am Sulfamylbutyryl Harz aufgebaut. Die erste Aminosäurekupplung in konventionellen Lösungsmitteln wie z.B. Dimethylformamid (DMF) liefert nur schlechte Ausbeuten und muss in CHCl₃ mit unpolaren Harzen durchgeführt werden muss (detaillierte Beschreibung in Abschnitt 4.4.1, Seite 72). Die restliche SPPS verläuft allerdings in konventioneller Weise (DMF, 2-(6-Chloro-1H-benzotriazol-1-yl)-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HCTU) als Kupplungsreagenz usw.). Das Sulfonamid der wachsenden Peptidkette **23** ist während der Abspaltung gegen das verwendete Piperidin stabil, da die Deprotonierung des aciden Acylsulfonamides schneller verläuft und die delokalisierte negative Ladung die Elektrophilie des Acylsulfonamides stark reduziert.^[90] Durch eine Alkylierung des Acylsulfonamid-Stickstoffes mit Trimethylsilyl (TMS)-Diazomethan oder Iodacetamid wird diese Delokalisierung unterbunden und das Acylsulfonamid kann nukleophil durch Amine oder Thiolate angegriffen werden. Der *N*-Terminus muss während dieses Prozesses mit einer Schutzgruppe (SG) versehen sein. In Gegenwart katalytischer Mengen von Natriumthiophenolat und einem Thiol im Überschuss wird ein geschützter Peptidthioester erhalten, der nach TFA-Behandlung den Peptidthioester **5** ergibt.



Schema 2.6: Übersicht zur Peptidthioestersynthese nach Fmoc-Strategie. AS = Aminosäure, SG = Schutzgruppe.

Eine vielgenutzte Methode, erstmals von der Arbeitsgruppe *Hojo* beschrieben, ist in Schema 2.6 B dargestellt.^[92] Dabei wird das Peptid an dem von *Barlos et al.* entwickelten Chlorotrityl- oder 2-Chlorotritylharz aufgebaut.^[93] Die Befestigung der ersten Aminosäure geschieht über den nukleophilen Angriff des Aminosäurecarboxylates an dem Tritylharz. Nach der Fmoc-SPPS wird das geschützte Peptid mit 1% TFA oder AcOH/2,2,2-Trifluoroethanol (TFE) vom festen Träger gespalten und die so erhaltene geschützte Peptidsäure mit einem gewünschten Thiol verestert, um den geschützten Peptidthioester **24** zu erhalten. Bei der Thioesterbildung ist die Racemisierung der

aktivierten *C*-terminalen Aminosäure ein Problem. Die Arbeitsgruppe von *Beck-Sickinger* hat ein optimiertes Protokoll mit Benzotriazolyl-1-oxy-tripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat (PyBOP) und niedrigen Temperaturen vorgestellt, welches die Racemisierung minimiert.^[94] Nach der TFA-Behandlung steht der entschützte Thioester **5** zur Verfügung.

Hoyo et al. stellten 2007 eine weitere nützliche Strategie vor (Schema 2.6 C).^[95] Als erste Aminosäure wird ein *N*-alkyliertes Cysteinderivat auf dem festen Träger gekuppelt. Das Wunschpeptid wird mittels Fmoc-SPPS in der Folge aufgebaut und mit TFA vom Harz getrennt. Die durch die *N*-Alkylierung begünstigte *cis*-Konformation des Zwischenprodukts **25** unterliegt bei saurem pH-Wert einem reversiblen *N*→*S* Acyltransfer zu dem Thioester **26**. Bei Überschuss eines Thiols wird dieser Thioester in das Produkt **27** überführt. Ethylreste erzielten in obiger Veröffentlichung die höchsten Ausbeuten unter den getesteten (Me, Et, *i*Bu, Bn). Durch Veränderung des Restes R' kann die benötigte Protonenkonzentration soweit erniedrigt werden, dass der Acyltransfer unter neutralen Bedingungen stattfindet. Die Thioestervorstufe **25** kann dann in einer Eintopfreaktion im Ligationspuffer *insitu* zum Thioester **27** umgewandelt werden, um anschließend mit einem *C*-terminalen Fragment verknüpft zu werden. Thioestervorstufen die sich im Ligationspuffer *insitu* zu Thioestern umwandeln, werden unter dem Namen Crypto-Thioester zusammengefasst.^[96]

Eine Methode aus dem Jahr 2008 wurde von *Blanco-Canosa et al.* vorgestellt (Schema 2.6 D).^[97] Die Peptidkette wird an einem 3,4-Diaminobenzoyl-Linker aufgebaut **28**. Die Positionen 3 und 4 werden üblicherweise im Verhältnis 4:1 acetyliert. Die Acetylierung des zweiten Amins wird durch die erste Acetylierung verhindert. Nach Kupplung aller Aminosäuren kann das verbleibende Amin der Position 3 oder 4 mit 4-Nitrophenylchloroformiat **30** reagieren, worauf sich in dem Produkt **31** ein Ringschluß zum *N*-Acylbenzimidazol (Nbz) anschließt. Die TFA-Abspaltung liefert das Peptid **32**. Es kann entweder direkt in der NCL eingesetzt werden oder durch Thiolzugabe in den Thioester **5** überführt werden. Freie *N*-Termini nach der Kupplung mit Essigsäureanhydrid zu acetylieren ist in vielen Fällen nützlich und daher ein Standardprotokoll in vielen Peptidarbeitsgruppen. Dies war jedoch in der ursprünglichen Methode nicht möglich. Außerdem wurde –vor allem bei Glycin-Kupplungen– eine Acetylierung des freien Amins in **29** beobachtet.^[98] Dieses Problem wurde von *Ottesen et al.* durch die Allyloxycarbonyl (Alloc)-Schätzung des freien Amins nach der ersten Aminosäurekupplung gelöst.^[98] Darüber hinaus wurde eine Überacetylierung sowie die Bildung von 3/4-

Regisomeren 2015 von *Blanco-Canosa et al.* durch Methylierung der Position 3 des Diamins **28** verhindert.^[99]

Fang et al. haben eine weitere Methode ebenfalls von dem Chlorotrityl-Harz ausgehend publiziert (Schema 2.6 E).^[100] Zuerst wurde die Verwendung von Wang-Harz beschrieben,^[101] der Chlorotrityl-Träger zeigte aber bessere Resultate.^[94-95] Das Chlorid-Harz wird erst mit Hydrazinhydrat behandelt. Anschließend wird das Peptid nach der konventionellen Fmoc-Strategie aufgebaut und abgespalten. Hierbei wird das Peptidhydrazid **33** erhalten. Dieses Peptid kann einfach aufgereinigt und gelagert werden. In der Regel wird der Peptidthioester erst vor der NCL erzeugt. Dies geschieht nach *Curtius* (Abschnitt 2.2) durch die Zugabe von Natriumnitrit unter sauren Bedingungen (pH 3-4). Auf diese Weise wird erst das Azid **34** generiert. Dann wird der entsprechende Thioester **5** *in-situ* im thiolhaltigen Ligationspuffer gebildet und kann mit dem Cysteinylpeptid reagieren.

Hou et al. stellten 2010 erstmals eine Crypto-Thioester-Strategie vor die später von der Arbeitsgruppe *Melnyk* weiterentwickelt wurde.^[102] Bei dieser Technik wird zuerst Chlorotrityl-Harz mit Bis(2-sulfanylethyl)amin umgesetzt (Schema 2.6 F).^[103] An dem zweifach Thioether-verankerten Amin wird das Peptid aufgebaut. Anschließend kann das Bis(2-sulfanylethyl)amido (SEA)-Peptid **35** durch TFA-Abspaltung erhalten werden. In dieser Form ist ein direkter Einsatz für die NCL möglich. Im Ligationspuffer wird der Thioester **5** durch Thioladditive gebildet. Peptid **35** kann auch mit Iod zum zyklische Disulfid **36** oxidiert werden. Dieses kann leicht gereinigt und gelagert werden. Im Ligationspuffer mit TCEP wird das Disulfid reduziert, wobei sich erneut Amid **35** bildet und durch *N*→*S* Acyltransfer ein Peptidthioester erhalten wird.

2.3 Post-translationale Modifikationen in Peptiden & Proteinen

Post-translationale Modifikationen (PTMs) von Proteinen modulieren dessen Aktivität und erweitern die Diversität und Komplexität ihrer biologischen Funktion. Dementsprechend spielen PTMs in Signalwegen, Proteinfaltung, Lokalisation, Enzymaktivität sowie Proteinstabilität eine entscheidende Rolle.^[104]

Unter PTMs werden in der Regel post-translationale Veränderungen der Aminosäure-Seitenketten verstanden. Diese Seitenkettenmodifikation ist für 15 der 20 protei-nogenen Aminosäuren bekannt. Eine Übersicht ist in Tabelle 2.2 aufgeführt. Die fünf häufigsten PTMs sind Phosphorylierung (vgl. Schema 2.7 A), Acylierung, Alkylierung,

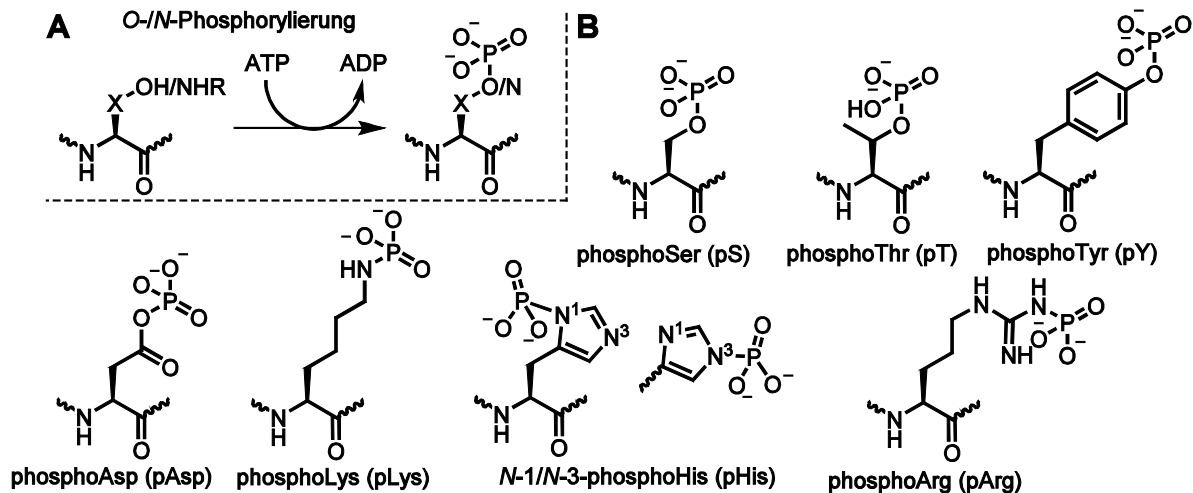
Glykosylierung und Oxidation. Im Folgenden wird nur auf die Phosphorylierung eingegangen. Ausführliche Übersichtsartikel über alle anderen erwähnten PTMs sind z.B. von *Walsh et al.*^[104b] sowie von *Davis et al.*^[104a] vorhanden.

Tabelle 2.2: Übersicht und Zuordnung der häufigsten PTMs nach *Walsh et al.* Von Leu, Ile, Val, Ala und Phe sind keine PTMs bekannt.^[104b]

Rest	PTM	Beispiel
Asp	Phosphorylierung	Proteintyrosinphosphatasen
	Isomerisierung zu isoAsp	Antwortregulatoren in Zweikomponentensystemen
Glu	Methylierung	Chemotaxis-Rezeptorproteine
	Carboxylierung	γ -Carboxyglutaminsäure-Reste bei der Blutkoagulation
	Polyglycinierung	Tubulin
	Polyglutamylierung	Tubulin
Ser	Phosphorylierung	Proteinserinkinasen/-phosphatasen
	<i>O</i> -Glycosylierung	<i>O</i> -Glycosylierung des Notch-Rezeptors
	Phosphopantetheinylierung	Fettsäuresynthase
Thr	Phosphorylierung	Proteinthreoninkinasen und -phosphatasen
	<i>O</i> -Glycosylierung	
Tyr	Phosphorylierung	Tyrosinkinasen und -phosphatasen
	Sulfatierung	Reifung des CCR5-Rezeptors
	<i>ortho</i> -Nitrierung	Entzündungsreaktionen
	TOPA-Chinon	Reifung der Aminoxydase
His	Phosphorylierung	Sensorproteinkinasen in Zweikomponentensystemen
	Aminocarboxypropylierung	Bildung von Diphthamid
	<i>N</i> -Methylierung	Methyl-CoM-Reduktase
Lys	<i>N</i> -Methylierung	Methylierung von Histon
	<i>N</i> -Acylierung durch Acetyl-, Biotinyl-, Lipoyl-, Ubiquityl-Gruppen	Acetylierung von Histon, prosthetische Gruppen am Schwingarm, Ubiquitin, Proteinmarkierung durch kleine ubiquitinähnliche Marker (SUMOs)
	C-Hydroxylierung	Reifung von Collagen
	Cys	
Cys	<i>S</i> -Hydroxylierung (S-OH)	Sulfenatzwischenstufen
	Bildung von Disulfidbrücken	Proteine in oxidierenden Umgebungen
	Phosphorylierung	PTPasen
	<i>S</i> -Acylierung	Ras
	Prenylierung	Ras
Met	Oxidation zu Sulfoxid	Met-Sulfoxidreduktase
Arg	<i>N</i> -Methylierung	Histone
	<i>N</i> -ADP-Ribosylierung	GS α
Asn	<i>N</i> -Glykosylierung	<i>N</i> -Glykoproteine
	<i>N</i> -ADP-Ribosylierung	eEF-2
	Proteinspließen	Inteinspaltung (Schema 2.3 A, Seite 10)
Gln	Transglutaminierung	Proteinvernetzung
Trp	<i>C</i> -Mannosylierung	Plasmamembranproteine
Pro	<i>C</i> -Hydroxylierung	Collagen, HIF-1 α
Gly	<i>C</i> -Hydroxylierung	Bildung <i>C</i> -terminaler Amide durch Gly-(hydroxy)Gly Spaltung

2.3.1 Proteinphosphorylierung

Die PTM der Phosphorylierung ist ein ubiquitärer regulatorischer Mechanismus in Eukaryonten und Prokaryonten. Obwohl die Phosphorylierung von Proteinen schon 1906 von *Levene* und *Alsberg*^[105] entdeckt wurde, dauerte es 50 Jahre bis die enzymatische Phosphorylierung durch Kinasen von *Burnett* und *Kennedy*^[106] aufgeklärt wurde. Die reversible Phosphorylierung spezifischer Aminosäureseitenketten ist in den meisten biologischen Systemen das zentrale Steuerelement der Zellregulation. Es stellte sich heraus, dass die Enzyme, die die Phosphorylierung und Dephosphorylierung, katalysieren die größte bekannte PTM-Enzymklasse repräsentieren. Für diese Superfamilie der Proteinkinasen wurde der Begriff Kinome definiert.^[107] Unter dem Verbrauch von Adenosintriphosphat (ATP) katalysieren sie die Phosphorylierung von vier sauerstoffhaltigen (pS, pT, pY, pAsp) und drei stickstoffhaltigen Aminosäureseitenketten (pLys, pHis, pArg) (Schema 2.7).



Schema 2.7: **A:** O-/N-Phosphorylierung sauerstoff- oder stickstoffhaltiger Aminosäureseitenketten. **B:** Bisher in biologischen Systemen gehäuft gefundene phosphorylierte Aminosäurereste.

Obwohl pS (1969)^[108], pT, pLys, pHis, und pY (1979)^[109] innerhalb von zehn Jahren entdeckt wurden,^[110] wurden lediglich die O-Phosphoamiosäurereste hinsichtlich ihrer Rolle in unterschiedlichen Signalwegen ausgiebig untersucht. Ursachen hierfür liegen in der Stabilität der Sauerstoffphosphorylierung *in vivo* und *in vitro*.^[111] In der auf Phosphorylierung spezialisierten Datenbank *Phosphosite* sind bei 53'425 gelisteten Proteinen 165'044 nicht-redundante Einträge für Phosphoserin, 68'907 Einträge für Phosphothreonin und 43'645 Einträge für Phosphotyrosine zu finden (Stand 25.08.2016).^[112] Es gibt keine Einträge für N-Phosphoamiosäuren. Die gemessene N-Phosphorylierung wurde lange Zeit als Artefakt der Messung betrachtet. Häufig entging die Anwesenheit

von *N*-phosphorylierten Aminosäuren der Aufmerksamkeit, da die Stickstoff-Phosphorbindung unter sauren Bedingungen hydrolysierte.^[113] Fast jede Probenvorbereitung für die Massenspektrometrie beinhaltet die Verwendung von Säuren, um eine ausreichende Ionisierung zu gewährleisten. Die Existenz von *N*-Kinasen wurde erst spät von der wissenschaftlichen Gemeinschaft akzeptiert. Phospholysin wurde zuerst 1974 in nuklearen Proteinen von regenerierenden Rattenleberzellen gefunden, dort besonders auf Histon H1.^[114] Seit den frühen 1970er Jahren waren mehrere Histidinkinasen in Ratten-^[114-115] und später auch in Humanzellen^[116] bekannt, die Histidine in Histone H4 phosphorylieren. Eine Protein-Argininkinase die 1994 aus Mäuseleukämiezellen extrahiert wurde, zeigte Kinaseaktivität durch die Phosphorylierung mehrerer Argininreste auf dem Histon H3.^[117] Trotz dieser und anderer Daten wurde der Einfluss von *N*-Phosphorylierung auf biologische Signalwege weitgehend ignoriert. Dies mag mit der erschwerten Handhabung der Proben sowie der mangelnden Verfügbarkeit zielgerichteter biologischer und chemischer Synthesen der zu untersuchenden *N*-phosphorylierten Proteine zusammenhängen.

2.3.2 Chemische Synthese von phosphorylierten Peptiden & Proteinen

Durch rekombinante Proteinsynthese können relativ verlässlich gefaltete Proteine mit den 20 natürlich kodierten Aminosäuren erhalten werden. PTM-Proteine stellen aber bis auf wenige Ausnahmen eine Herausforderung dar. Phosphoproteine können durch Expression und darauffolgende Phosphorylierung hergestellt werden. Doch limitieren die mangelnde Verfügbarkeit geeigneter Kinasen, die geringe Regioselektivität, die niedrigen Phosphorylierungsausbeuten sowie die schwierige Trennung zwischen phosphorylierten und nicht phosphorylierten Proteinen, einen einfachen und allgemein gültigen Zugang.

Die chemische Synthese von phosphorylierten Peptiden und Proteinen unterliegt diesen Limitationen nicht. Mit den chemischen Methoden lassen sich gezielt und mit hoher Ausbeute phosphorylierte Aminosäurereste einbauen. Dabei gibt es zwei unterschiedliche Strategien: (1.) Die Einführung von vorgefertigten Phosphoaminosäure-Bausteinen oder (2.) die postsynthetische globale Phosphorylierung.

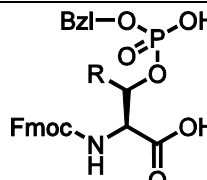
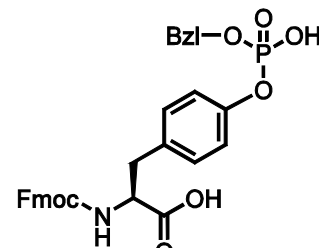
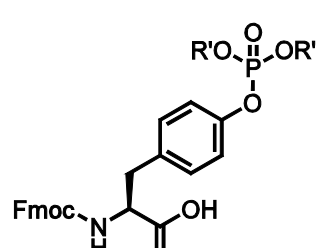
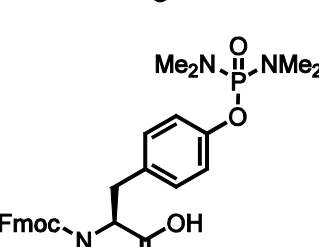
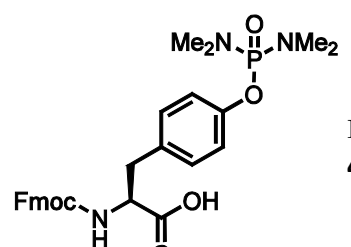
Die erste Strategie greift auf Aminosäurebausteine zurück, bei denen die Phosphorylierung an der Seitenkette schon eingebaut ist.

Bei der globalen Phosphorylierung –der zweiten aufgeführten Strategie– kann eine Schutzgruppenstrategie verwendet werden. Die zu phosphorylierende Aminosäureseitenkette wird selektiv entschützt und anschließend in Lösung oder am festen Träger phosphoryliert, danach wird das restliche Peptid entschützt. Hier kann z.B. auf die Errungenschaften der chemischen DNA-Synthese zurückgegriffen werden. So wurden von *Liskamp et al.* partiell entschützte Peptide am festen Träger mit Phosphoramiditen *O*-phosphoryliert.^[118] Eine weitere Spielart der globalen Phosphorylierung ist die Verwendung von bioorthogonalen funktionellen Gruppen. Nach der TFA-Abspaltung kann die bioorthogonal modifizierte Aminosäure chemoselektiv phosphoryliert werden. Die chemische Synthese *N*-phosphorylierter Peptide ist besonders anspruchsvoll, da üblicherweise am Ende der Synthese mit TFA oder stärkeren Säuren das Peptid vom polymeren Träger gespalten wird. Unter diesen Bedingungen zerfällt allerdings die Phosphoamidatgruppe. Aus diesem Grund kann die erste Strategie der Phosphobausteine nicht verwendet werden. Um die gewünschten *N*-Phospholysin-Peptide zu erhalten, wurde kürzlich von der Arbeitsgruppe *Hackenberger* eine neue Methode vorgestellt.^[119] Hierbei erfolgte eine Staudinger-Phosphitreaktion mit ε -Azidolysin an ungeschützten Peptiden, die die gewünschten *N*-Phosphopeptide lieferte.

Im Gegensatz dazu lassen sich Peptide die phosphorylierte Ser, Thr oder Tyr-reste beinhalten relativ leicht nach der Phosphobaustein-Strategie herstellen. Die Phosphobausteine werden an gewünschter Stelle während der SPPS eingebaut. Eine Übersicht über gängige Fmoc-SPPS Bausteine ist in Tabelle 2.3 zu finden. Für den Einbau von Phosphotyrosin, sind freie Phosphate **40**, Phosphodiester **39**, Triester **41** sowie Phosphoamide **42** verfügbar. Auf Grund der Tendenz mit benachbarten Tyr(PO₃H₂)-Resten Pyrophosphate zu bilden, wird Fmoc-Tyr(PO₃H₂)-OH **40** eher selten verwendet. Die Benzyl-Aminosäure-Phosphorsäurediester Fmoc-AS(PO(OBzl)OH)-OH (AS = Ser **37**, Thr **38**, Tyr **39**) sind die am häufigsten verwendeten Bausteine für den pS, pT und pY Einbau.^[120] Allerdings reagiert die acide Hydroxylgruppe während jedes Kupplungszyklus mit einem Äquivalent der zu kuppelnden Aminosäure. Das entstehende gemischte Säureanhydrid wird zwar im Abspaltungsschritt in aller Regel wieder quantitativ gespalten, dennoch ist die Verwendung dieses Bausteins nicht atomökonomisch und limitiert das Arsenal möglicher Reaktionen an der festen Phase, wie z.B. der Alkylierung. Um dies zu verhindern, wurde Fmoc-Tyr(PO(OMe)₂)-OH **41** entwickelt.^[121] Der aufgeführte Phosphotriester wird allerdings durch Piperidin demethyliert und zeigt dann ein ähnliches Verhalten wie die Benzylester **37-39**. Darüber hinaus benötigen die

Methylester TMSBr/TFA, um zum Phosphat umgesetzt zu werden. Die Phosphorsäuretriester induzieren bei Thr und Ser während der Fmoc-Abspaltung eine β -Eliminierung. Deshalb werden sie für diese Aminosäuren nicht eingesetzt.

Tabelle 2.3: Übersicht über Phosphoaminosäurebausteine für den Einbau von pS, pT und pY mittels Fmoc-SPPS.^[120]

Phosphoaminosäure	Name	Kommentar	Referenz
	R = H: Fmoc-Ser(PO(OBzl)OH)-OH 37 R = Me: Fmoc-Thr(PO(OBzl)OH)-OH 38	Kupplung am besten mit Iminium basierten Reagenzien ^[122] , Abspaltung mit TFA, Nebenreaktionen durch Benzylkation. ^[120]	<i>Wakamiya et al., 1994^[123]</i> <i>White and Beythien, 1996^[124]</i>
	Fmoc-Tyr(PO(OBzl)OH)-OH 39	Kupplung am besten mit Iminium basierten Reagenzien, Hydroxylgruppe wird acyliert, ^[125] Abspaltung mit TFA, Nebenreaktionen durch Benzylkation. ^[120]	<i>White und Beythien, 1996^[124]</i>
	R' = H: Fmoc-Tyr(PO ₃ H ₂)-OH 40	Kupplung mit Iminium basierten Reagenzien, Pyrophosphat Bildung ^[126]	<i>Ottinger et al., 1993^[127]</i>
	R' = Me: Fmoc-Tyr(PO(OMe) ₂)-OH 41	Kompatibel mit allen Kupplungsmethoden, Demethylierung durch Piperidin, Abspaltung mit TMSBr/TFA	<i>Kitas et al., 1989^[121]</i>
	Fmoc-Tyr(PO(NMe ₂) ₂)-OH 42	Kompatibel mit allen Kupplungsmethoden, Abspaltung mit TFA/Wasser (9:1)	<i>Chao et al., 1995^[128]</i>

Generell unterliegen auch die Bausteine **37** und **38** β -Eliminierung zum Dehydroalaninrest bei Ser (**37**) oder zum 2-Amino-2-en-butylsäure-Rest bei Thr (**38**).^[129] Im besonderen Maße sind die Vorstufen von Phosphoserin und Threonin in der Mikrowelle während der basischen Fmoc-Abspaltung anfällig für β -Eliminierung.^[130] Weitere Probleme können bei der Verwendung von Benzylphosphorsäureestern durch das während der TFA-Abspaltung gebildete Benzylkation entstehen.^[120]

Für Fmoc-Tyr(PO(NMe₂)₂)-OH **42** sind keine Nebenreaktionen während der Kupplung oder Abspaltung bekannt. Im Vergleich zur standardmäßig durchgeführten Peptidabspaltung (~1.5h), ist die benötigte Zeit der Phosphodiamidat-Hydrolyse in

TFA/Wasser (10%) jedoch relativ lang (~16h). Indessen kann es zu Nebenreaktionen mit anderen Aminosäureresten^[131] und sogar zur Dephosphorylierung kommen.

2.4 Peptidsynthese und -reinigung ohne HPLC

Nach der Synthese werden Peptide mit einer Säure vom festen Träger getrennt. Eine abschließende Reinigung ist erforderlich, da ein Gemisch vorliegt, das aus dem gewünschten Produkt, peptischen Nebenprodukten und weiteren Verunreinigungen besteht. In den allermeisten Fällen wird die HPLC zur Reinigung verwendet.

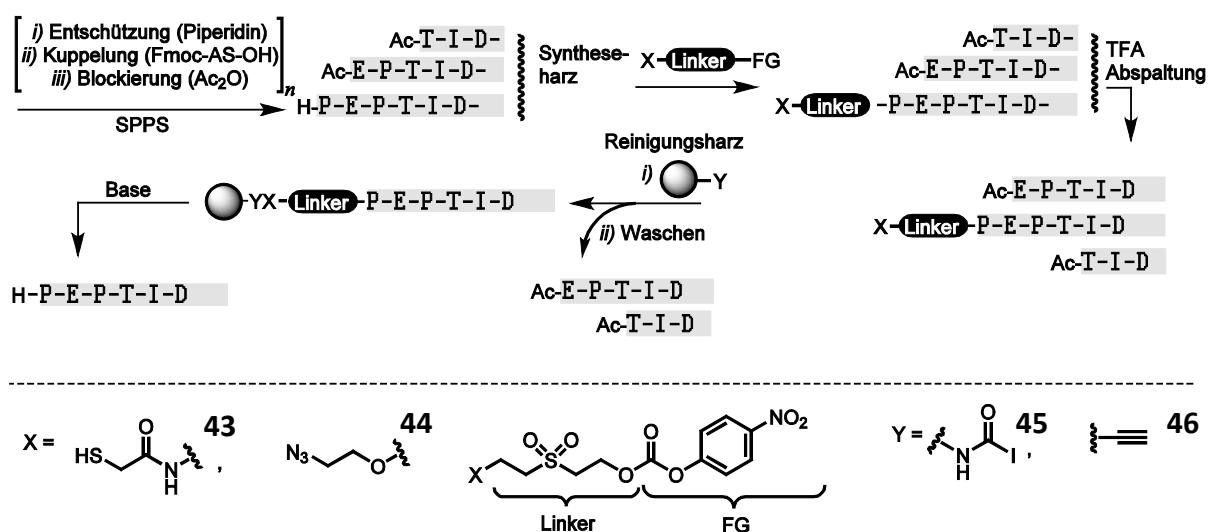
Aufgrund ihres hydrophoben Profils interagieren Peptide während der HPLC-Reinigung unterschiedlich stark mit dem Säulenmaterial. Demzufolge können sie mit Acetonitril (ACN) nacheinander aus dem Säulenmaterial eluiert werden. Schwierig zu entfernende Verunreinigungen sind in aller Regel Abbruchsequenzen, d.h. Peptide die durch eine unvollständige Aminosäurekupplung nur eine Teilsequenz der Zielsequenz tragen (Schema 2.8). Die HPLC-Methode weist vier entscheidende Nachteile auf:

- (1.) Die Reinigung mit Hilfe der HPLC ist schlecht skalierbar. Größere Mengen an Peptid müssen auf einer großtechnischen Anlage oder in mehreren Reinigungsschritten auf einer herkömmlichen kleinen Anlage gereinigt werden.
- (2.) Das Verfahren ist sehr zeitaufwendig, da für mehrere Peptide jeweils eine HPLC-Reinigung angesetzt werden muss. Reinigungen mehrerer Peptide erfolgen also sukzessive und nicht parallel. Wird eine parallele Reinigung erwünscht müssen mehrere Geräte parallel betrieben werden.
- (3.) Bei schwierigen Trennungen mit einer handelsüblichen HPLC-Anlage kann nach dem ersten Reinigungsversuch oft kein reines Produkt isoliert werden, da Nebenprodukte ähnlicher Hydrophobizität gleichermaßen auf der chromatographischen Säule retendieren.^[132] Auf solche misslungenen Trennversuche folgt in der Regel eine Optimierung der Synthese und der Reinigung.
- (4.) Es werden große Mengen des organischen Lösungsmittels ACN benötigt. Dies muss hoch-rein verwendet werden und ist somit sehr teuer.

Vor allem bei der Synthese von vielen Peptiden im Hochdurchsatz ist die HPLC Reinigung durch ihren nichtparallelen Charakter nicht mehr effizient durchführbar. Deshalb werden Peptidbibliotheken meist ungereinigt verwendet und können dadurch zu falsch-positiven oder falsch-negativen Ergebnissen führen. Alternative Methoden für die Hochdurchsatz-Synthese gereinigter Peptide sind daher wünschenswert.

2.4.1 Reinigungsmethoden nach der „Catch & Release“ Methode

Zwei sehr ähnliche Verfahren zur Peptidreinigung ohne HPLC wurde von 1991 *Funakoshi* ^[133], und 2010 von *Aucagne et al.* beschrieben ^[103b,134]. Bei dem vorgestellten „Catch & Release“ System werden während der Synthese des Peptids nach jedem Kupplungsschritt freie *N*-Termini mit Essigsäureanhydrid blockiert (Schema 2.8). Somit stehen diese Abbruchsequenzen nicht mehr für die Kupplung mit den nächsten Aminosäuren zur Verfügung. Im letzten Kupplungsschritt wird ein Fängermolekül auf den *N*-Terminus des Volllängenpeptids aufgebracht. Nach der Abspaltung vom festen Träger (Syntheseharz) wird die Peptidmischung mit einem Reinigungsharz behandelt, wobei das Fängermolekül-modifizierte Zielpeptid selektiv mit dem Reinigungsharz reagiert. Ungewünschte Abbruchsequenzen und andere Verunreinigungen (z.B. Produkte der Seitenkettenschutzgruppen-Abspaltung) können anschließend herausgewaschen werden (Schema 2.8). Das Zielpeptid wird durch basische Behandlung, die die Spaltung des Sulfonlinkers (**43,44**) bewirkt, modifizierungsfrei erhalten. *Funakoshi* verwendete ein Thioacetamid-modifiziertes Fängermolekül **43** und Iodacetamid funktionalisiertes Kieselgur **45** zur Reinigung. ^[133] Der Nachteil bei dieser Methode ist, dass Peptide mit Thiofunktionen wie etwa Cysteinylopeptide ebenfalls angereichert werden.



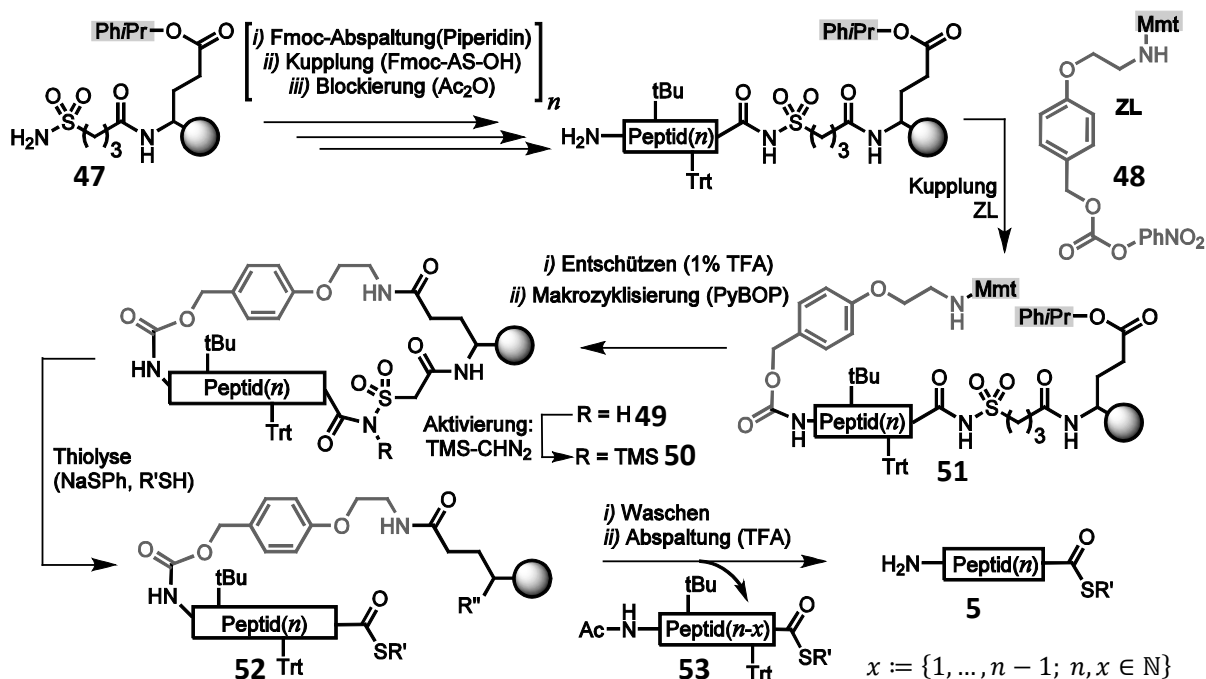
Schema 2.8: HPLC-freie Peptidreinigung nach dem Catch & Release Prinzip. Anwendungsbeispiele von *Funakoshi* und *Aucagne et al.* X = Ankergruppe des Fängermoleküls, Y = Ankerpunkt am Reinigungsharz. FG = Fluchtgruppe.

Nach *Aucagne* wird ein Azid-modifiziertes Fängermolekül **44** verwendet. Die Verknüpfung zum Alkin funktionalisierten Polyethylenglycol-dimethylacrylamid (PEGA)-Reinigungsharz **46** erfolgt durch 1,3-dipolare Alkin-Azid-Cycloaddition (CuAAC). Mit dieser Methodik wurde ein nicht-natives 154-mer Mucin-Peptid (MUC1) durch sukzessive C-terminale Verlängerung des immobilisierten Volllängenpeptids iterativ aus vier Teilen hergestellt. ^[134a] Das Konzept wurde auch auf die NCL am festen Träger erweitert,

wobei die SEA-Thioester-Technik (Schema 2.6 F, Seite 15) mit der beschriebenen Immobilisierung/Reinigungsmethodik kombiniert wurde. Auf diese Weise wurde eine 136 Aminosäuren lange Teilsequenz des humanen Hepatozyten-Wachstumsfaktors mittels sequenzieller Fragmentkondensation von fünf Teilen ohne HPLC-Reinigung synthetisiert.^[103b]

2.4.2 Selbstreinigende Peptidthioestersynthese

Eine HPLC-freie Synthese, der sonst nur schwer zugänglichen α -Peptidthioester, wurde erstmals im Jahr 2007 von *Mende* und *Seitz* vorgestellt.^[135] Im Jahr 2010 wurde es in einer verbesserten Form für die Synthese von 16 Cysteinmutanten der SH3-Domäne des Hefe-Proteins SHO1 verwendet.^[136] Das Konzept beruht auf der Verwendung eines Safety-Catch-Linkers **22** (Schema 2.6 A). Dieses harzständige Sulfonamid wurde um eine säurelabile Phenylisopropyl (Ph/Pr)-geschützte Glutaminsäure C-terminal erweitert. So wird eine zusätzliche Verknüpfungsstelle am polymeren Träger geschaffen **47** (Schema 2.9). Nach der Kupplung auf das Sulfonamid **47** (Abschnitt 4.4.1, Seite 72) wird das Peptid nach konventioneller Fmoc-SPPS aufgebaut, wobei auch hier ein Blockierungsschritt nach jeder Aminosäurekupplung nötig ist.



Schema 2.9: HPLC-freie Synthese von α -Peptidthioestern mit Selbstreinigungseffekt nach *Seitz et al.* ZL = Zyklisierungslinker. Peptid (n) = Peptid mit n Aminosäuren, $R'' = \text{NHCO}(\text{CH}_2)_3\text{SO}_2\text{NCH}_2\text{SiMe}_3$.

Im letzten Schritt der Kettenverlängerung wird der Zyklisierungslinker (ZL) **48** auf das Volllängenpeptid aufgebracht. Anschließend kann die Monomethoxytrityl (Mmt) und Ph/Pr Schutzgruppe simultan durch die Behandlung mit 1% TFA entfernt werden. Die

freigelegte Amino- und harzständige Carboxyfunktion reagieren durch eine anschließende Zugabe von PyBOP miteinander. Hierbei wird der Makrozyklus **49** gebildet. Die Aktivierung des Sulfonamids **49** durch Alkylierung mit TMS-Diazomethan zu **50** erhöht die Elektrophilie des Carbonylkohlenstoffs der Peptidsulfonamidbindung. Die Carboxyfunktion wird für Nukleophile angreifbar. Unter Verwendung von Natriumthiophenolat als Katalysator und eines geeigneten Thiols, liefert die Thiolyse den harzgebundenen Thioester **52** und trennt die Abbruchsequenzen vom Harz. Durch Waschen des polymeren Trägers können nun die Abbruchsequenzen **53** vom Harz entfernt werden. Abschließende Behandlung mit TFA liefert den gewünschten Thioester **5** in hohen Reinheiten. Ein wesentlicher Vorteil der Methode ist, dass der *N*-Terminus des Volllangenpeptids, im Gegensatz zur der üblicherweise verwendeten *Safety-Catch* Methodik nicht speziell geschützt werden muss. Außerdem entfällt ein Arbeitsschritt, bei dem die geruchsintensive Thiolyse-Mischung eingeengt und anschließend mit TFA behandelt werden muss. Somit können Nebenreaktionen bei diesem Schritt nicht geschehen. Die Abbruchsequenzen liegen beim Waschen als vollgeschützte *N*-acetylierte Thioester vor und haben dadurch in fast allen Lösungsmitteln eine geringe Löslichkeit (Kapitel 4.4 auf Seite 72). Die geringe Löslichkeit und die Tendenz der Abbruchsequenzen am polymeren Träger adsorbiert zu bleiben sind die größten Nachteile der Methode. Es sind häufig mehrere Waschzyklen nötig, um ein sauberes Produkt zu erhalten.

2.5 Protein und Peptidarrays

Durch die Proteinmikroarray- und Proteinbiochip-Technologie wurde es möglich ganze Proteome parallel zu analysieren.^[12] Dabei wurden Techniken verwendet, welche für die DNA-Mikroarrays entwickelt wurden. Die Methodik teilt sich typischerweise in drei grundlegende Schritte:

- (1.) Die Erzeugung einer definiert lokalisierten, zweidimensionalen Anordnung von Probemolekülen (Rezeptor oder Ligand) durch eine post-synthetische Immobilisierung oder durch die Synthese auf einer Oberfläche (Kapitel 2.5.2, Seite 32).
- (2.) Die Behandlung der Oberfläche mit einer Lösung von einem oder mehreren Analyten oder Substraten. Anschließend wird Nichtgebundenes gewegewaschen.
- (3.) Die nachfolgende Detektion der gebundenen Analyten oder umgesetzten Substrate, welche Rückschlüsse auf die Funktion des Probemoleküls gestattet.

Diese Technologie erlaubt die simultane Analyse tausender Interaktionen mit nur einem Experiment. Bei klassischen Proteinmikroarrays werden Mikrotröpfchen von

Proteinen in Reihen und Spalten angeordnet. Anschließend wird eine Probe mit tausenden bindenden Molekülen, Proteinen, Peptiden oder anderen Analyten aufgetragen. Die gebundenen Moleküle können durch Fluoreszenz, Chemilumineszenz, Massenspektrometrie, Radioaktivität oder Elektrochemie nachgewiesen werden.^[137]

Meilensteine der Proteinarraytechnologie wurden in den 2000er Jahre gelegt. Tausende Proteine wurden parallel exprimiert, gereinigt, immobilisiert und funktionell untersucht. So demonstrierten *Zhu et al.* 2001 die parallele Expression und Immobilisierung von 5800 unterschiedlichen rekombinanten Proteinen der Backhefe *S. cerevisiae*. Dabei wurden komplexe Proteinchips generiert, die über 90% der Gene des Organismus enthielten.^[138] Mit diesen Mikroarrays konnten Protein-Protein-Interaktionen auf einer genomweiten Skala identifiziert werden. Obwohl die Proteinarrays ein sehr großes Potential zeigen, wurden sie bislang nur in relativ wenig Fällen eingesetzt. Besonders in dem Forschungsfeld der Wirkstofffindung findet sie wenig Anwendung.^[139] Proteinarrays werden häufig mit DNA-Arrays verglichen. Teilweise erreichen Proteinarrays vergleichbare Dichten wie DNA-Arrays. Die Konstruktion der Proteinarrays ist allerdings komplexer als die Herstellung von DNA-Mikroarrays, was in der höheren Vielfalt funktioneller Gruppen in Proteinen begründet ist. Der Unterschied in der Komplexität ist weiterhin der unterschiedlichen Natur von DNA und Proteinen geschuldet. Die Funktion von DNA beschränkt sich auf die komplementäre Basenpaarung nach *Watson* und *Crick*.^[140] Eine hohe Duplex-Stabilität wird bereits ab einer vergleichsweise geringen Länge von ca. 18 Nukleotiden erreicht.^[141] Im Gegensatz dazu benötigen Proteine eine größere Länge um eine stabile Faltung und Funktion zu besitzen. Zum Beispiel sind die kürzesten funktionellen Proteine die folgenden Protein-Domänen: Zinkfinger (~30 AS)^[142], WW2 (~40 AS)^[143] und SH3 (~60 AS)^[144]. Trotz dieser vergleichsweise großen Länge, ist eine native Faltung nicht garantiert. Die Faltung wird auf Mikroarrays weiterhin durch chemische Behandlungen oder die Immobilisierung gefährdet.^[145] Eine weitere Hürde ist die Generierung der Proteine. Bisherige Verfahren nutzen c-DNA-Bibliotheken, die in *E. Coli* oder Insektenzellen exprimiert werden.^[146] Große Nachteile der Methode sind die geringen Ausbeuten an gefalteten Proteinen und das Fehlen von PTMs. Obwohl mit Insekten-, oder *Chinese-Hamster-Ovary*-Zellen eukaryontische Expressionssysteme zur Verfügung stehen, welche sich für ein Hochdurchsatzverfahren eignen, zeigen die erhaltenen Proteinarrays nur geringe Mengen an Phosphorylierung (15% der humanen Phosphorylierung).^[145a] Es wurde außerdem nicht analysiert, ob es sich bei den Phosphorylierungsstellen um human-analoge Positionen handelt.^[145a]

2.5.1 Oberflächenimmobilisierung von Proteinen und Peptiden

Zu den entscheidenden Herausforderungen für einen aussagekräftigen Proteinchip gehört die korrekte Wahl des Untergrunds sowie die Entwicklung einer Immobilisierungschemie, die native Konformation und biologische Funktion erhält.^[147]

Glas ist das am häufigsten verwendete Trägermaterial. Darüber hinaus werden noch Quarz-, Siliciumwafer, Polystyrol (PS) oder Goldoberflächen verwendet. Glas bietet viele Vorteile und wird dadurch für Mikroarrays sehr häufig verwendet, da es kostengünstig-verfügbar, plan, rigide und transparent ist sowie wenig zu unspezifischer Adsorption neigt. Außerdem lässt sich Glas gut chemisch funktionalisieren. Die Siliciumbasierten Materialien werden vor dem Beschichten mit einer Piranha-Lösung ($\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{SO}_4$) oder Sauerstoffplasma angeätzt, um sie zu reinigen und die Silanolgruppen zur chemischen Modifizierung offen zu legen. Organofunktionale Silane der allgemeinen Struktur $(\text{RO})_3\text{Si}(\text{CH}_2)_n\text{X}$ oder Trichlorsilane werden verwendet, um neue funktionelle Gruppen auf der Oberfläche zu erzeugen.^[148] Goldoberflächen wurden ebenfalls zahlreich in der Biosensorik angewendet und können leicht mit Thiolen, Disulfiden und Sulfiden funktionalisiert werden.^[139] Die selbstassemblierte Monolage, die sich bei Verwendung von Alkylthiolen bildet, ist für die Proteinimmobilisierung nicht immer ideal, da die Proteine sehr dicht gepackt sind.^[149] Vorteilhaft ist allerdings, dass sich Protein-Ligand-Wechselwirkungen auf Goldoberflächen mittels Oberflächenplasmonenresonanz-spektroskopie (engl. *surface plasmon resonance*, Abk. SPR) untersuchen lassen.^[150]

Die Probemoleküle (Rezeptor oder Ligand) können kovalent oder nicht-kovalent auf der Oberfläche immobilisiert werden. Die kovalente Anbindung ist stabiler. Trotzdem wird auch die nicht-kovalente Befestigung häufig verwendet, da sie leichter zu realisieren ist. In beiden Kategorien existieren regioselektive und nicht-regioselektive Immobilisierungsarten. Mit der regioselektiven Immobilisierung (siehe Seite 30) ist hier die chemoselektive Anbindung einer einzelnen funktionellen Gruppe oder Gruppierung in einer bestimmten räumlichen Orientierung gemeint. Nachfolgend werden Vor- und Nachteile beider Arten diskutiert.

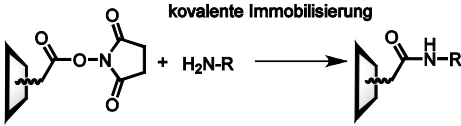
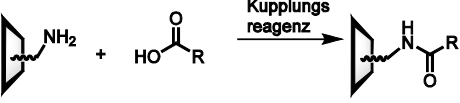
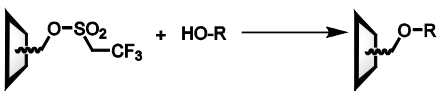
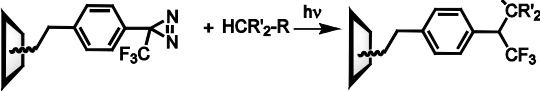
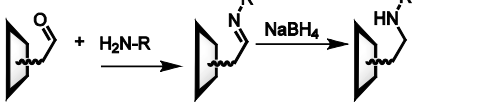

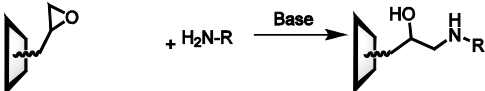
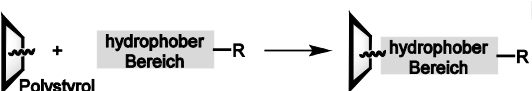
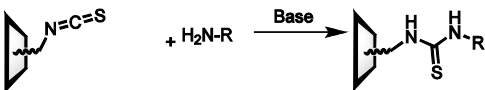
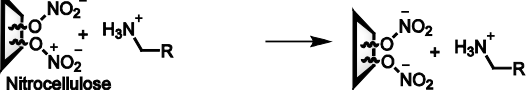
Nicht-regioselektive Immobilisierung auf Protein-Arrays

Die nicht-regioselektive Immobilisierung wird häufig verwendet, obwohl die Gefahr einer unspezifischen Anbindung besteht. Dies kann die biologische Funktion der Probemoleküle stören. Sie hat aber den Vorteil, dass man das zu immobilisierende Molekül

nicht mit einer speziellen funktionellen Gruppe modifizieren muss. Besonders bei Proteinen vereinfacht dies die Herstellung und somit die Produktion des Mikroarrays. In Tabelle 2.4 ist eine Übersicht häufig genutzter Immobilisierungsarten gegeben.

Bei der kovalenten Anbindung werden meist Aminofunktionen des Lysins sowie des *N*-Terminus mit der Oberfläche zur Reaktion gebracht. Dafür stehen die Succinimid-Aktivesterkupplung,^[151] die reduktiven Aminierung mit Aldehyden,^[152] die Epoxidöffnung^[153] sowie die Reaktion mit Isothiocyanaten^[152a] zur Verfügung. Ebenso können die weniger reaktiven Alkoholsektenketten von Ser, Thr und Tyr mit Trifluorethylsulfonat modifizierten Oberflächen umgesetzt werden.^[154] Alternativ kann die Immobilisierung über aktivierte Carbonsäureester der Asp- und Glu-Reste mit aminofunktionalisierten Oberflächen erfolgen.^[155] Diese Aminosäuren befinden sich in der Mehrzahl an der Oberfläche von Proteinen. Nachteilig ist allerdings die mögliche Quervernetzung mit Lysinseitenketten, die die Proteinaktivität beeinträchtigen kann.^[139]

Tabelle 2.4: Auflistung verschiedener nicht-regioselektiver Immobilisierungsverfahren (R = Protein, Peptid).

Immobilisierungsverfahren	Ref.	Immobilisierungsverfahren	Ref.
<p>kovalente Immobilisierung</p>  <p>[151]</p>		 <p>[155]</p>	
 <p>[154]</p>		 <p>[156]</p>	
 <p>[152]</p>		<p>nicht-kovalente Immobilisierung</p>  <p>[157]</p>	
 <p>[153]</p>		 <p>[158]</p>	
 <p>[152a]</p>		 <p>[159]</p>	

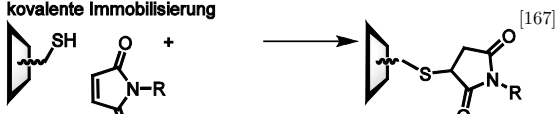
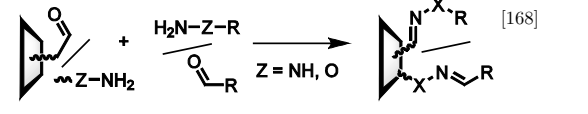
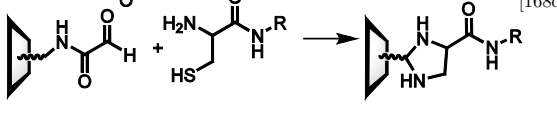
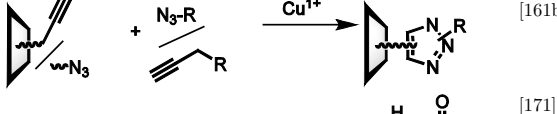
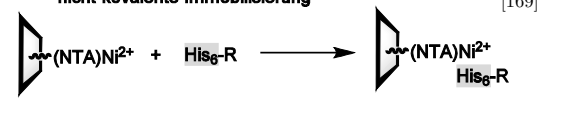
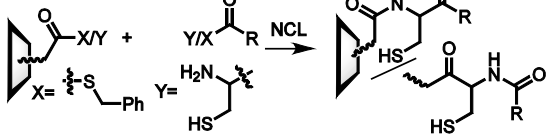
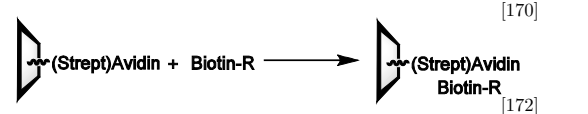
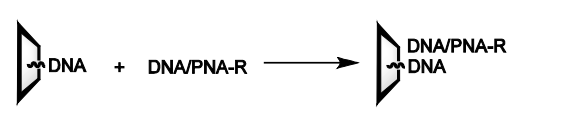
Nicht-kovalente Immobilisierungen haben den Vorteil, dass sie minimal invasiv und einfach in der Handhabung sind. Nachteile sind jedoch die Diffusion auf der Oberfläche sowie die mangelnde Stabilität bei Lagerung und wiederholter Verwendung. Häufig werden Proteine über elektrostatische Wechselwirkungen immobilisiert. Verbreitet ist die Immobilisierung über Polyamine, in Form von Polylysinen oder dendritischen Aminen, die bei physiologischen pH-Wert protoniert vorliegen und als Kation mit Carboxylresten des Proteins eine ionische Bindung eingehen.^[157] Außerdem finden Nitrocellulose

beschichtete Materialien Verwendung. Die Immobilisierung erfolgt hierbei mit Hilfe einer Mischung aus elektrostatischer und hydrophober Wechselwirkung.^[159] die Verankerung von Proteinen auf Polystyrol (PS) oder PS-beschichteten Oberflächen, wird am häufigsten verwendet, obwohl der Bindungsmechanismus nicht aufgeklärt ist. Besonders effektiv haften hydrophobe Peptidsequenzen, die zusätzlich Arg- oder Lys-Reste tragen, an der PS-Oberfläche.^[158]

Regioselektive Immobilisierung auf Protein-Arrays

Die regioselektive Immobilisierung erlaubt es eine gewünschte Proteinorientierung und somit eine native Proteinfaltung zu begünstigen. Daraus ergeben sich folgende Anforderungen: Die Proteinimmobilisierung sollte chemoselektiv verlaufen. Es sollte kontrollierbar sein, welche funktionelle Gruppe oder welches Ankermolekül eines Proteins mit der Oberfläche verbunden wird. Darüber hinaus sollte die Verknüpfung gerichtet sein. Das heißt, es soll nur eine Proteinorientierung auf der Oberfläche eingenommen werden ohne dass dabei die Faltung noch die Zugänglichkeit zur Bindungstasche gestört wird.^[160] Dies bedeutet zwangsläufig, dass die Methode bioorthogonal sein muss. Die gewünschte Reaktion muss also eine hohe Selektivität besitzen und nicht durch die funktionellen Gruppen des Proteins oder des Puffers beeinflusst werden. Einschrittmethoden sind bevorzugt. Außerdem spielt die Komplexität der Proteinmodifikation vor der Immobilisierung eine wichtige Rolle, da sie in das rekombinante Protein eingebracht werden muss.^[161] Eine Auflistung gängiger regioselektiver Immobilisierungsverfahren ist in Tabelle 2.5 dargelegt. Einige etablierte Methoden nutzen Modifikationen welche sich mit rekombinanten Methoden leicht realisieren lassen. Beispiele hierfür sind *N*-terminierte Cysteinyproteine oder Peptide, welche mittels Thiazolidinbildung auf Glyoxal-Oberflächen verankert werden können. Auch können Cysteinylopeptide auf Thioesterfunktionalisierten Flächen immobilisiert werden. Bei dem Einbau unnatürlicher Aminosäuren als Reaktionspartner in Proteine ist eine Synthese relativ komplex. Es gibt die Möglichkeit unnatürliche Aminosäuren über das „*genetic-code engineering*“^[162] oder das „*genetic-code expansion*“^[163] Verfahren einzubauen. Ebenso kann die EPL chemisch-synthetische Peptide, welche die gewünschte Modifikation tragen, in rekombinante Protein einführen (Kapitel 2.2.2, Seite 9). Des Weiteren können regioselektive Modifikation durch eine chemische Behandlung eingebaut werden. Beispielsweise lassen sich in Glykoproteinen^[164] und in *N*-terminale Ser- oder Thr-Polypeptiden durch Behandlung mit NaIO₄ gezielt Aldehydfunktionalitäten erzeugen.^[165] Enzymatische Aldehydgeneration ist bei spezifischen Sequenzen ebenso möglich.^[166]

Tabelle 2.5: Auflistung verschiedener regioselektiver Immobilisierungsverfahren (R = Protein, Peptid).

Immobilisierungsverfahren	Ref.	Immobilisierungsverfahren	Ref.
kovalente Immobilisierung			
	[167]		[168]
	[168d]	nicht-kovalente Immobilisierung	
	[161b]		[169]
	[171]		[170]
			[172]

Intein*-Thioester^[173] (Schema 2.3 B) und Proteinester^[174] lassen sich darüber hinaus mit Hydrazin behandeln, um C-terminale Proteinhydrazide zu erhalten. Aldehyd-, Hydrazin, Hydrazid und Hydroxylamin sind nützliche bioorthogonale Reaktionspartner in der Hydrazon- und Oximligation, die auch für die regioselektive Immobilisierung Verwendung findet. Diese sehr schnelle und unter pH 5.5 hoch chemoselektive Reaktion wurden von *Bertozzi et al.* im biochemischen Kontext intensiv erforscht und für die Biokonjugation *in-vivo* ausgenutzt.^[175] Die Katalyse mit Anilin, die die Reaktion darüber hinaus noch schneller und in geringen Konzentrationen effizienter machte, wurde 2008 von *Dawson et al.* vorgestellt. Sie stellte zu der Zeit die schnellste bekannte Biokonjugationsmethode dar.^[168b,c] Sie ist schneller als die Kupfer katalysierte CuAAC,^[176] die auch als „Click-Reaktion“ bezeichnet wird, um ihren schnellen Charakter zu unterstreichen.^[168b] Die Click-Reaktion findet ebenso Anwendung als gerichtete Immobilisierungsmethode. Das Alkin oder das Azid kann für die Oberflächenmodifizierung verwendet werden, entsprechend wird eine Azid- oder Alkingruppe im Protein benötigt. Der Einbau dieser Gruppen gestaltet sich schwierig. Aus diesem Grund wird meist ein Alkin- oder Azid-modifiziertes Peptid mittels EPL eingeführt.^[161b,177] *Lin et al.* haben gezeigt, dass ein Azid auf der Oberfläche und die Alkinfunktion im Protein vorteilhaft für die Immobilisierung ist.^[161b]

Für eine regioselektive nicht-kovalente Immobilisierung wird vielfach die sehr affine Biotin-Streptavidin oder Biotin-Avidin-Bindung ausgenutzt.^[170] Eine weitere Methode ist die Verwendung einer Hexahistidin-Markierung (His₆) am Protein. Diese bindet über die freien Koordinationsstellen ($K_D = 0.1 \mu\text{M}$)^[139] des Nickel-Nitrilotriacetat (Ni-NTA)-

Affinitätsankers.^[169] Eine sehr nützliche nicht-kovalente Immobilisierungstechnik ist die Konjugation von Proteinen oder Peptiden mit DNA oder Peptid-Nukleinsäuren (engl. *peptide nucleic acid* Abk. PNA), um diese dann gezielt auf DNA-Mikroarrays zu immobilisieren.^[172] Dies hat auch den Vorteil, dass bei entsprechender Kodierung kein Spotter verwendet werden muss. Die Probe kann über den gesamten Chip uniform aufgetragen werden, da durch die Basenpaarung die Lokalisation der Probenmoleküle festgelegt ist.

2.5.2 Synthese von Proteinen und Peptiden auf Arrayoberfläche

Die direkte Synthese der Probemoleküle auf Arrayoberflächen ist für Oligonukleotide und Peptide beschrieben worden, weil diese molekularen Ketten aus einzelnen definierten Bausteinen linear aufgebaut werden können. Eine parallele Synthese ist somit einfach realisierbar. Die existierenden Verfahren bedienen sich meist der Photolithographie. Für DNA-Arrays werden nach *Fodor et al.* Synthesestrategien eingesetzt, die photolabile-Schutzgruppen verwenden.^[178]

Die verbreitetste Synthese von Peptid-Arrays ist die von *Frank et al.* entwickelte SPOT-Synthese.^[179] Die Aminosäurebausteine werden in aktivierter Form in Lösung auf einer zweidimensionalen Membran pipettiert. Die Verankerung des Peptids erfolgt über eine Esterbindung mit der Membran. Die Abspaltung und Kettenverlängerung verläuft analog durch das Pipettieren der entsprechenden Lösungen auf den Spot. Nach der Synthese erfolgt die Analyse meist direkt auf der Membran. Es besteht ebenfalls die Möglichkeit die Synthese auf einer Zellulosemembran durchzuführen. Bei der Behandlung mit TFA löst sich diese Membran auf und ein Peptid-Zellulose-Konjugat bleibt zurück. Es kann in hoher Dichte auch auf anderen Trägern immobilisiert werden.^[180] Seit ihrer Entdeckung, wurde die SPOT-Synthese vielfach für die Herstellung von Peptid-^[181] sowie einmal von Protein-Domänen-Arrays^[171a] verwendet.^[182] Allerdings ist die Diffusion der Kupplungslösung (Kriechen) innerhalb der Membran ein Nachteil, wodurch im Vergleich zu anderen Trägermaterialien nur eine geringe Auflösung erreicht werden kann (~ 25 Peptide/cm²).^[183] Außerdem führt die große Oberfläche zur Wasserabsorption und kürzeren Reaktionszeiten auf Grund von Verdampfung des Lösungsmittels, was die erzielbaren Ausbeuten bei Kupplungsreaktionen erniedrigt.

Auch photolithographische Verfahren werden für die Peptidsynthese eingesetzt. Dabei werden analog zu den DNA-Mikroarrays photolabile Schutzgruppen verwendet. Mittels geeigneter Photomaske werden nur bestimmte Peptide bestrahlt und deblockiert. Anschließend wird dann die zu kuppelnde Aminosäure global auf den Chip gegeben.

Nur die entschützten Peptide wachsen um die entsprechende Aminosäure an. Es wird also pro Kupplungszyklus nur ein Aminosäurederivat verknüpft. Es handelt sich daher um eine eher langsame Vorgehensweise, die aber dichte Peptidarrays mit hoher Auflösung (*Fodor et al.*, 640 Peptide/cm²) liefert.^[184]

Ein ähnliches Verfahren zur SPOT-Synthese wurde von *Bischoff* und Mitarbeitern vorgestellt.^[185] Dabei werden Aminosäure-Pentafluorophenylester in einem bei Raumtemperatur festem Lösungsmittel als Kugel auf einer Chipoberfläche aufgetragen. Die Partikel sind zur Auftragung und zur Immobilisierung triboelektrisch aufgeladen. Anschließend werden die Sphären durch Laserbestrahlung auf über 90°C erhitzt, wobei das Lösungsmittel schmilzt und die Aminosäuren zur Reaktion gebracht werden. Als Lösungsmittel wird meist *N,N*-Diphenylformamid verwendet. Das Verfahren ist sehr schnell und ermöglicht Arraydichten von 400 Peptiden pro cm².

Die gegenwärtig verfügbaren Methoden der Peptid-Array-Technologie erlauben es Peptide mit hohen Dichten und gerichteter Oberflächenimmobilisierung zu liefern. Allerdings sind die erreichbaren Längen durch schlechten Kupplungsausbeuten geringer als bei Festphasen-basierten Synthesen. Außerdem gibt es keine analytische Methodik um die Integrität (Sequenz, Racemisierung oder Nebenreaktionen) der Peptide zu überprüfen. Es entstehen also leicht falsch-positive oder -negative Einzeltreffer. Daher bleiben die beschriebenen Methoden im Allgemeinen auf die Herstellung von kurzkettigen Peptidarrays begrenzt.

Die Arbeitsgruppe um *Schneider-Mergener* nutzte 2003 die Vorteile der SPOT-Synthese aus, um unterschiedliche *N*-terminale Cysteinylopeptidfragmente auf einer Zellulosemembran zu synthetisieren und sie anschließend global mit einem Peptidthioester umzusetzen.^[171a] Dabei wurde die 38-Reste lange WW-Domäne des Yes-Kinase assoziierten Proteins (hYAP) synthetisiert, wobei das *C*-terminale Cysteinylfragment (24-mer) an den Positionen 30, 32 und 35 durch 19 Aminosäuren (alle außer Cystein) substituiert wurden. Daraus ergaben sich 6859 (19³) Variationen, die mit zwei Peptidbindern mit Hilfe von SPR hinsichtlich ihrer Bindungsaffinitäten charakterisiert wurden.

Wie eingangs angeführt, gestatten rekombinante Methoden einen robusten Zugang zu langen Proteinen und Proteindomänen. Die Immobilisierung kann zwar die Funktion (Orientierung, Faltung oder Zugang zur Bindungstasche) der Proteine stören, trotzdem bleibt die rekombinante Synthese mit anschließender Verankerung des Proteins derzeit das Mittel der Wahl für die Herstellung von Protein-Arrays. Chemische Synthesen auf der Oberfläche werden bislang lediglich für kurzkettiger Peptid-Arrays eingesetzt.

Oberflächensynthesen durch Fragmentkondensation von Protein- oder Protein-Domäne-Arrays scheinen momentan nur auf *proof-of-principle* Studien ohne biologische Relevanz beschränkt zu sein.

Das Alleinstellungsmerkmal der chemischen Totalsynthese von Proteinen ist der gezielte Einbau von PTMs. Dieser große Vorteil wurde aber noch nicht für die chemische Synthese von Protein-Arrays nutzbar gemacht.

2.6 Biologischer Hintergrund von Abl, Arg und Bcr-Abl

Die beiden Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen der Familie Abelson (engl. *Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1*) Abl und Arg (auch Abl1 und Abl2) übermitteln extrazelluläre Signale zu Proteinnetzwerken die Fortpflanzung, Überleben, Bewegung und Invasion kontrollieren. Es wurde gefunden, dass die mRNA Level der ABL1- und ABL2-Gene in Krebszellen signifikant erhöht sind. Außerdem wurde besonders für Abl ein Zusammenhang der Kinaseaktivität zu der Tumorprogression hergestellt.^[186] Ein Fokus der Wirkstoffforschung war in den letzten zwei Jahrzehnten Tyrosinkinase-Inhibitoren zur Krebstherapie zu finden. Bis heute ist die erfolgreichste dieser Anstrengungen die Entwicklung der Abl-Kinase-Inhibitoren zur Behandlung der chronischen myeloischen Leukämie (CML).^[186] Der erste Inhibitor war Imatinib (Handelsname Glivec; Novartis), weitere Wirkstoffe folgten mit einer höheren Wirksamkeit.

Das Verständnis der Aktivierung der Abl-Tyrosinkinase ist besonders seit der Entdeckung der Verbindung zur CML Gegenstand intensiver medizinischer und biologischer Forschung. Die Pathologen *Bennet*^[187], *Craigie*^[188] und *Virchow*^[189] beschrieben im Jahr 1845 unabhängig voneinander die unnatürlich hohe Zahl an weißen Blutzellen in Patienten. *Virchow* beschreibt diesen Zustand als Blutkrankheit und prägt den Begriff Leukämie. Vermutlich hat *Virchow* damit die erste Beschreibung von CML geliefert.^[190] Im Jahr 1960 wurde durch *Nowell* und *Hungerford* eine einschlagende Entdeckung gemacht. Sie fanden die ursächliche Verbindung des Philadelphia-Chromosoms (Ph⁺) zu CML.^[191] Das Philadelphia-Chromosom war die erste identifizierte Chromosomenveränderung, die mit dem Beginn von Krebs in Beziehung gebracht worden ist. Mehr als 95% der CML-Patienten besitzen das Ph⁺. Es wird auch in anderen Krebszellen gefunden. Interessanterweise tragen 30% aller gesunden Individuen ebenfalls das Ph⁺ in sich, allerdings in einer sehr geringen Konzentration von 1-10 Zellen pro 10⁸ weißen Blutzellen.^[192] Die Chromosomenveränderung geschieht in hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark. Das Chromosom 9 bricht während der Zellteilung im Bereich q34.1 und

das Chromosom 22 in der Region q11.2 (Abbildung 2.1 A). Die Bruchstelle liegt bei beiden Chromosomen im Bereich von Genen: Das Gen für ABL auf Chromosom 9 und das BCR-Gen (*breakpoint cluster region*) auf Chromosom 22.

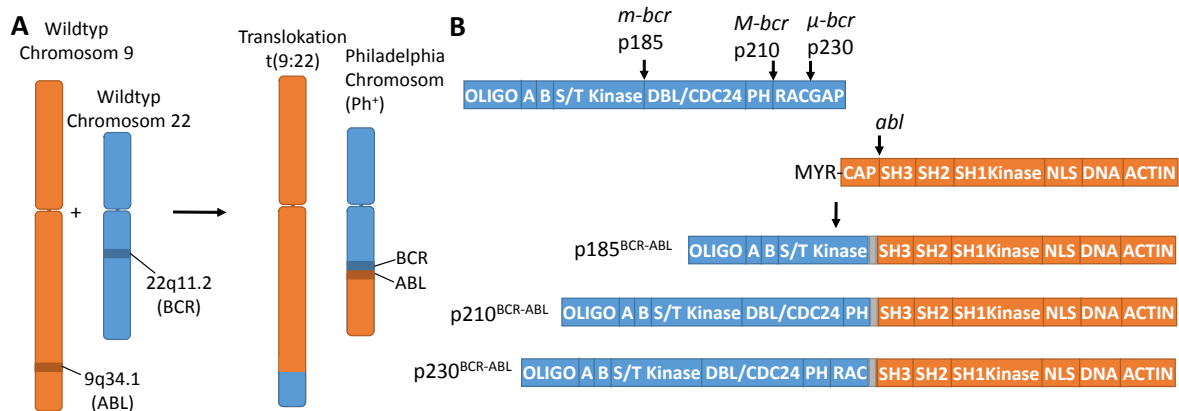


Abbildung 2.1 A: Translokation des Chromosoms 9 und 22 während der Zellteilung: Dabei brechen die beiden Chromosomen auseinander und werden vertauscht fusioniert, wobei die BCR- und ABL-Genabschnitte nebeneinander auf dem sog. Philadelphia-Chromosom enden. **B:** Die drei Breakpoint-Regionen des BCR-Genoms, welche verantwortlich für die überwiegend vorkommenden BCR-Abl-Fusionsproteine sind. BCR-Proteindomänen beinhalten: OLIGO = Oligomerisierung; A und B = A und B Boxen; DBL/CDC24 = Dbl-Homologie; PH = Pleckstrin-Homologie; RACGAP=Rac-GTPase. Abl-Proteindomänen beinhalten MYR = Myristoylierung-Signal; CAP = Hydrophobe-Region-Cap, NLS = Nukleare-Lokalisations-Domänen, DNA = DNA-Bindungsstellen und ACTIN = F- und G-Aktin-Bindungsstellen.

Während der Translokation wird der 5' Teil von BCR mit dem 3'-Element des ABL-Gens fusioniert. Das BCR-Gen kann dabei unterschiedlich gebrochen werden (*m*-, *M*-, oder *μ*-*bcr*). Das ABL-Gen weist nur eine Bruchmöglichkeit (*abl*) auf (Abbildung 2.1 B). Das längste Spaltprodukt der *minor breakpoint cluster* (*m-bcr*) umfasst 54-kb und resultiert in einer e1a2 mRNA, die das p185^{Bcr-Abl} Protein generiert. Der *major breakpoint cluster* (*M-bcr*) ist 5.8 kB lang und resultiert im p210^{Bcr-Abl} Fusionsprotein. Die dritte Bruchstelle ist am 3' Ende des (*μ*-*bcr*) lokalisiert, die entsprechende 9 kB mRNA formt das p230^{Bcr-Abl} Protein. Alle drei Bcr-Abl Fusionsproteine weisen eine sehr hohe Kinaseaktivität auf, welche ursächlich für die Progression der Krebstransformation ist.^[191] In Bezug auf Autophosphorylierung und Transphosphorylierung ist die Kinaseaktivität viel größer als im Wildtyp-Genprodukt der Abl-Tyrosinkinase, welche meistens in einem inaktiven geschlossenen Zustand vorliegt. Es wurde gezeigt, dass für eine zelluläre Entwicklung zu einer Leukämiezelle eine erhöhte Kinaseaktivität nötig ist. Eine Mutation in Ph⁺, welche für eine inaktive Bcr-Abl Kinase sorgt, inhibierte die zelluläre Transformation zu Leukämie.^[193] Um die Kinaseaktivität von Bcr-Abl zu verstehen, wurde die Aktivierung der Kinasen der Src-Familie, zu denen auch Abl gehört, untersucht.^[194] Dabei wurde folgender Mechanismus gefunden (Abbildung 2.2). Abl wird durch eine Bindung der N-terminalen Kappe vermittelt durch eine Myristoyl-Gruppe

(Myr.) mit der tiefen hydrophoben Tasche in der Kinase-Domäne in einer geschlossenen inaktiven Konformation gehalten. Statt einer Myr-Einheit kann die Bindung auch mit einer hydrophoben Sequenz stattfinden. Dieser „eingehakte“ *N*-Terminus von Abl platziert die SH2- und SH3-Domänen auf der Rückseite des großen und kleinen Teils der Kinase-Domäne. Außerdem bindet die SH3-Domäne die Interdomäne zwischen SH2- und Kinasedomäne intramolekular (*in cis*).

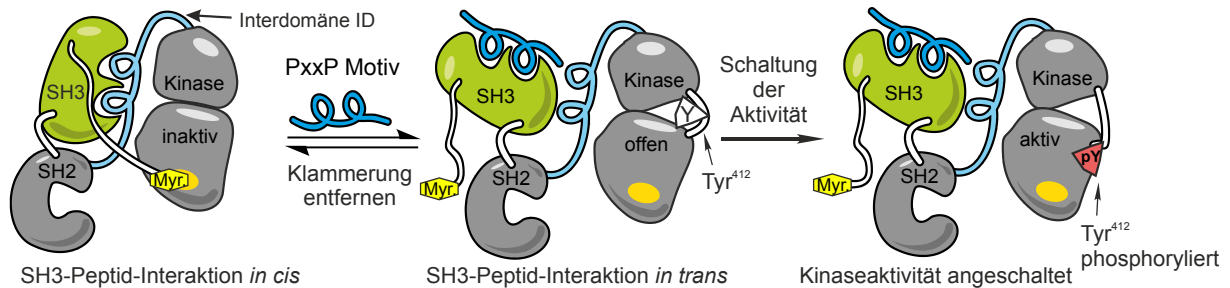


Abbildung 2.2: Drei-Stufen Aktivierungskaskade der Abl-Tyrosinkinase. Die Abl-Kinase wird durch eine *N*-terminale Myristoyl-Gruppe (Myr.) und einer Bindung der SH3-Domäne zu der SH2-Kinase Interdomäne (ID) *in cis* in einer geschlossenen inaktiven Konformation gehalten. Durch die intramolekulare Bindung *in trans* eines prolinreichen Liganden wird die Klammerung entfernt. Die Kinaseaktivität wird durch die Phosphorylierung des Tyr⁴¹²-Rests final angeschaltet.^[195] *in cis* = intramolekular, *in trans* = intermolekular

Diese „Klammer“ verhindert die Ausbildung der aktiven Konformation der Kinase-Domäne, die sich während der ATP-Prozessierung ständig öffnen und schließen können muss. Ein externer prolinreicher Binder kann die Klammer lösen, indem die Bindung der SH3- zur Interdomäne *in cis* durch eine intermolekulare Bindung (*in trans*) mit einem PXXP-Motiv verdrängt wird. Die SH3-Domäne wurde als Regulator der Kinaseaktivität bestätigt, da gekürzte Abl-Kinasen bei denen die SH3-Domäne fehlte eine sehr hohe Kinaseaktivität zeigten.^[196] Diese „Entklammerung“ führt aber noch nicht zur vollständigen Aktivierung, da sich noch eine Schleifenregion vor der Kinase-Domäne befindet. Phosphorylierung zum pTyr⁴¹² führt zu einer konformationellen Änderung und schaltet die Kinaseaktivität vollständig an.^[195]

In der Literatur wurde davon ausgegangen, dass Phosphorylierung innerhalb der SH3-Domäne im Allgemeinen die Affinität für prolinreichen Sequenzen herabsetzt.^[197] Eine Verringerung der Affinität wurde für die pY⁷-phosphorylierte Domäne mit einem Liganden, sowie der Interdomäne mittels Deuterium-Austausch bestimmt.^[198] Warmuth *et al.* zeigten außerdem, dass Phosphorylierung von Y⁷ durch die Hck-Kinase für die volle katalytische Aktivität von Bcr-Abl notwendig ist.^[199] Außerdem beobachteten Meyn *et al.*, dass die Position Y⁷ von Bcr-Abl in CML-Zellen zu einem hohen Prozentsatz phosphoryliert vorliegt und diese Phosphorylierung durch Kinasen der Src-Familie durchgeführt wird. Hier wurde ebenfalls beobachtet, dass bei Phosphorylierung eine

schnelle Zelltransformation stattfindet, bei Mutation zu Phenylalanin allerdings nicht.^[200] Die pY⁷-Phosphorylierung ist damit die am besten untersuchte Phosphorylierung innerhalb der Abl-SH3-Phospho-Domänen. Laut der *phosphosite* Datenbank sind allerdings alle drei Tyrosinreste der Abl-SH3-Domäne in Krebs-geschädigten Gewebe phosphoryliert (pY⁷ 14 Einträge, pY³⁰ 196 Einträge, pY⁵² 223 Einträge, Stand 09.09.2016). Für die am meisten biologisch untersuchte Phosphorylierungsstelle (pY⁷) sind allerdings nur 14 Einträge (4% der Einträge im Vergleich zu allen pTyr-Einträgen) gelistet. Die Arg-SH3-Domäne ist biologisch viel weniger untersucht. Dennoch gibt es Einträge, besonders für die Y⁵²-Position (pY⁷ 10 Einträge, pY³⁰ 1 Eintrag, pY⁵² 220 Einträge, Stand 09.09.2016). Die Positionen Y⁷, Y³⁰ und Y⁵² in der SH3-Domäne entsprechen den Positionen der Numerierung Y⁷⁰, Y⁹³ und Y¹¹⁵ im Abl-Protein sowie Y¹¹⁶, Y¹³⁹ und Y¹¹⁶ im Arg-Protein. Diese Phosphorylierungen wurden vor allem in Krebszellen besonders häufig in Leukämiezellen beobachtet.

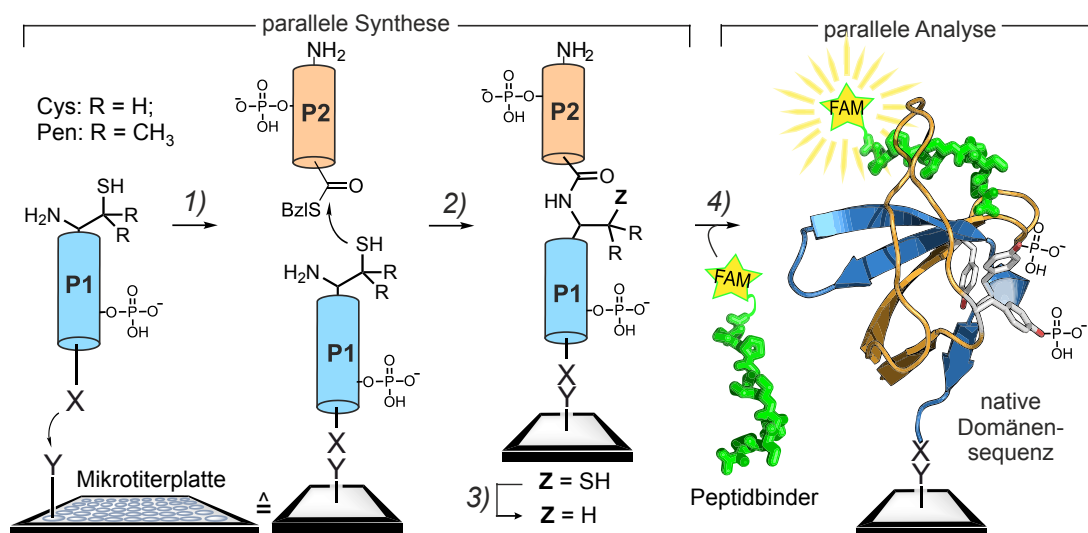
3. Kapitel: Zielstellung

Ziel dieser Arbeit ist, die Findung einer Methodik zur parallelen Synthese und Analyse von posttranslational modifizierten Proteindomänen (Schema 3.1). Es soll dabei die native chemische Ligation (NCL) zur Verknüpfung von Proteindomänen-Fragmenten auf der Oberfläche verwendet werden. Eine lineare Synthese auf der Oberfläche ist auf Grund der geringen Ausbeuten bei den benötigten Längen der Domänen (> 60 AS) nicht praktikabel. Da die HPLC-Reinigung einer parallelen Durchführung im Wege steht sollen die Domänen-Fragmente als Rohprodukte eingesetzt werden können. Für die Erreichung dieses Zieles müssen die folgenden Voraussetzungen erfüllt werden:

- (1.) Es muss eine Methode entwickelt werden, die für die NCL einsetzbare Proteinfragmente in hoher Reinheit der Rohprodukte zur Verfügung stellt. Diese Synthesestrategie muss phosphorylierte Peptidthioester (P2) und *N*-Cysteinylopeptide (P1) liefern können.
- (2.) Es soll weiterhin eine stabile regioselektive Immobilisierungsmethode gefunden werden, durch die Cysteinylopeptide (P1) auf einer Mikrotiterplatte stabil verankert werden können. Die Immobilisierung soll gegenüber den Bedingungen der NCL mit dem Thioesterfragment (P2) sowie einer eventuell notwendigen Entschwefelung stabil sein.
- (3.) Alle synthetischen Schritte müssen im Parallelformat idealerweise automatisiert durchführbar sein.
- (4.) Der Erfolg der Synthese muss überprüfbar sein.
- (5.) Die Erkennungseigenschaften der erhaltenen Protein-Domänen sollen anschließend mit potentiellen Bindern parallel untersucht werden können.

Eine mögliche Methodik, welche die oben genannten Voraussetzungen erfüllt, ist in Schema 3.1 gezeigt. *N*-Cysteinylopeptide (P1) oder andere entschwefelbare *N*-thiolierte Peptidfragmente (z.B. *N*-Penicillamin-Peptide) werden *C*-terminal auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Die Immobilisierungsmethode sollte schnell und spezifisch sein und gegenüber der im Anschluss notwendigen Behandlung stabil sein. Die *C*-terminalen Fragmente (P1) der zu untersuchenden Proteindomänen können als Rohprodukte verwendet werden, wenn während der Synthese ein Blockierungsschritt nach jeder Aminosäure-Kupplung durchgeführt wurde (Abschnitt 2.4.1, Seite 24). Dann können nur Voll-längenpeptide eine *N*-terminale Mercapto-Aminosäure tragen, die im Anschluss in einer NCL reagieren kann. Die Zugabe von Peptidthioestern ermöglicht die NCL auf der

Oberfläche. Für die Synthese dieser Thioester kann die selbstreinigende Peptidthioestersynthese verwendet werden, die Rohprodukte mit hoher Reinheit liefert (Abschnitt 2.4.2, Seite 25).



Schema 3.1: Allgemeine Zielstellung einer parallelen Synthese und Analyse von Protein-Domänen auf der Oberfläche mit Hilfe von 1) Immobilisierung, 2) NCL auf der Oberfläche, 3) Entschwefelung zur nativen Sequenz –wenn nötig– sowie 4) Faltung und Bindungsmessung mit FAM-markierten Peptiden.

Falls nötig kann in der Folge durch metall-freie radikalische Entschwefelung die Domänen-Mutante in die native Domäne überführt werden (Abschnitt 2.2.3, Seite 10). Besonders bei diesem Schritt bedarf es einer stabilen Oberflächenverankerung.

Diese dargelegten Syntheseschritte können parallel durchgeführt werden. Im Anschluss können die immobilisierten Domänen mit Fluoreszenz-markierten Peptiden behandelt werden. Mit Hilfe eines Plattenlesegeräts kann dann die Analyse aller Protein-Ligand-Interaktionen parallel quantifiziert werden.

Die erhaltenen Daten sollen dann durch andere Methoden überprüft und der Ursprung der Erkennungseigenschaften erforscht werden. Die Methodik kann dazu dienen Informationen über Protein-Protein-Interaktionen zu liefern. Der Fokus liegt dabei auf der Veränderung des Erkennungsrepertoires der analysierten Proteindomänen durch post-translationale Modifikationen. Dies soll exemplarisch für die Tyrosin-Phosphorylierung durchgeführt werden.

4. Kapitel: Ergebnisse und Diskussion

In dieser Arbeit werden ausschließlich *Src-homology 3* (SH3)-Protein Domänen untersucht. Obwohl die systematische Charakterisierung der SH3-Domänen erst relativ jung ist, zählt sie mittlerweile zu einem der vermutlich am besten untersuchten Proteininteraktionsmodule. Sie wurde erstmals 1988 von *Mayer*^[144] und *Stahl*^[201] als Domäne beschrieben. Diese ca. 60 Aminosäuren zählende Domäne bindet mit moderater Affinität prolinreiche Liganden und spielt dabei eine wichtige Rolle in biologischen Prozessen wie der Assemblierung von Multiproteinkomplexen bis hin zu der Enzymregulation durch intramolekulare Interaktion (Abschnitt 2.6, Seite 34).^[202] SH3-Domänen mit mannigfaltigen Funktionen wurden in vielen Organismen gefunden. Über die SH3-Domäne gibt es bereits eine Fülle an genetischen, biochemischen und strukturellen Informationen. Die SH3-Domäne gilt als ein ideales Modellsystem, um beispielsweise Fragen nach zellulärer Spezifität und der generellen Logik von Proteininteraktions-Netzwerken zu untersuchen. Strukturell bestehen die SH3-Domänen aus fünf β -Faltblattsträngen. Diese sind in zwei senkrecht angeordneten β -Faltblättern organisiert, die durch eine 3_{10} -Helix getrennt sind (Abbildung 4.1 A).^[203] Die Erkennung prolinreicher Binder wird im Allgemeinen durch die stark-konservierten aromatischen Aminosäuren Tyr, Trp, Phe und His erzeugt (Abbildung 4.1 B, blau-markiert). Das SH3-Domänen-spezifische Erkennungsrepertoire wird durch die rot-markierten Aminosäuren bewirkt.^[204]

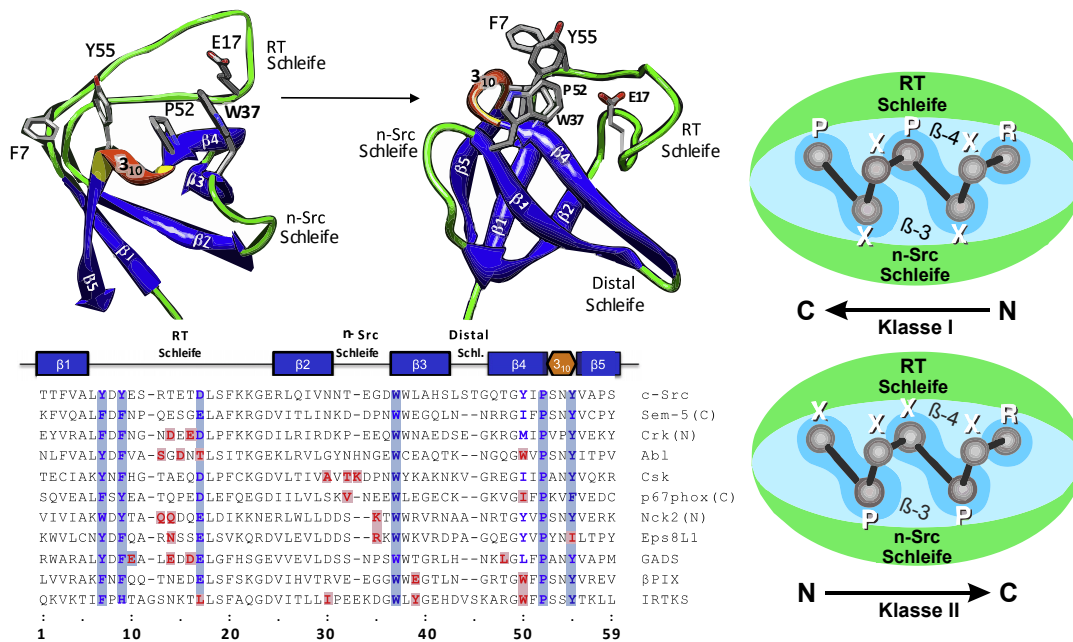


Abbildung 4.1 A: Struktur der SH3-Domänen, am Beispiel der Kristallstruktur von Sem-5 SH3. B: Sekundärstruktur und konservierte (blau) und Spezifität-gebende (rot) Aminosäurereste in mehreren SH3-Domänen sind gezeigt.^[204] C: Bindungsklassen der SH3-Domänen.^[202]

Je nachdem wie prolinreiche Liganden gebunden werden (Abbildung 4.1 C), teilt man die Domänen in zwei Klassen ein. Klasse-I-SH3-Domänen binden bevorzugt das Motiv $[R/K]XXPXXP$ in $C \rightarrow N$ Richtung. Im Gegensatz dazu binden Klasse-II-Domänen verstärkt $XPXXPX[R/K]$ -Liganden in $N \rightarrow C$ Richtung zwischen der RT- und der n-Src-Schleife. Bei den Wechselwirkungen mit den prolinreichen Peptidsträngen treten vor allem die Schleifenregionen und die β -Stränge β -3 und β -4 in Aktion (Abbildung 4.1 A und C).^[202]

4.1 Synthese der Hefe-SH3-Domäne von YSC84 auf Ni-NTA funktionalisierten Mikrotiterplatten

In dieser Arbeit wurde zunächst die Synthese einer SH3-Protein-Domäne aus dem Proteom der Backhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) in Angriff genommen. Das Hefeproteom weist 29 SH3-Domänen in 25 Proteinen auf.^[205] Die zu synthetisierende Domäne stammt aus dem Protein YSC84, welches an der Organisation des Actin-Cytoskeletts, an der Endocytose und dem Vesikeltransport beteiligt ist.^[206]

4.1.1 Synthese der YSC84 SH3-Domäne via Cystein-Scan

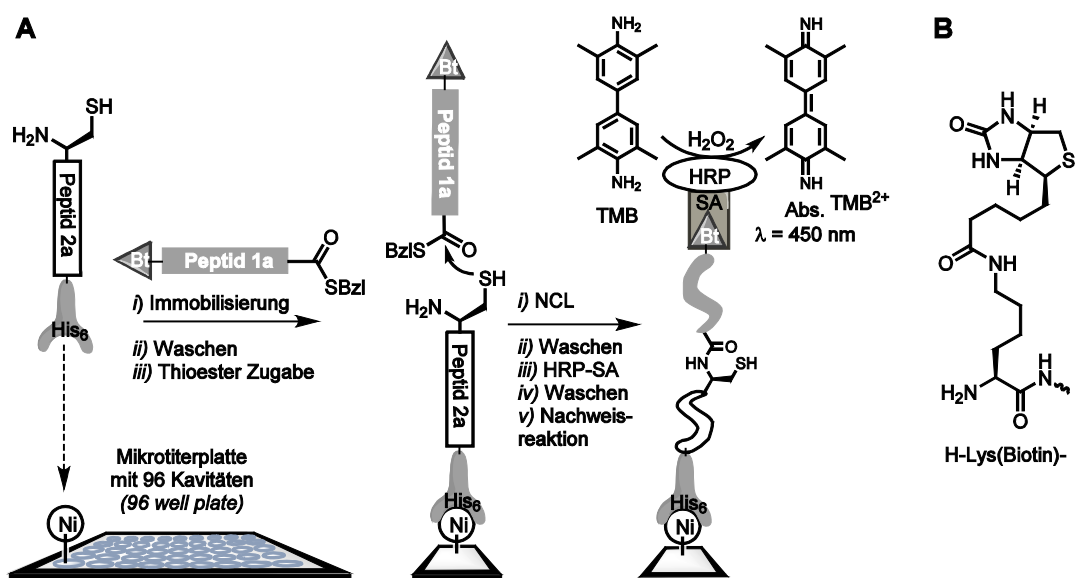
Um der Limitation des Cysteins an der Verknüpfungsstelle der NCL zu entgehen, gibt es neben den Methoden der erweiterten NCL (Auxiliar- und Entschwefelungsmethoden Abschnitt 2.2.3, Seite 10) die Möglichkeit einen „Cystein-Scan“ zu nutzen. Ein Cystein wird retrosynthetisch an einer geeigneten Aminosäureposition eingebaut, so dass die Faltungseigenschaften des Proteins nicht gestört werden. Dies hat den Vorteil, dass zusätzliche Arbeitsschritte für eine Auxiliar-Abspaltung oder eine Entschwefelung entfallen. Häufig werden Positionen gewählt, die sich in einer Schleifenregion befinden und somit wenig Einfluss auf die Faltung haben. Ein Effekt auf die Bindungsfähigkeit ist allerdings schwer vorherzusagen. Um eine geeignete Stelle zu ermitteln, die weder Faltung noch Bindung stört, werden in einem für die Ligation nützlichen Bereich alle in der natürlichen Sequenz vorhanden Aminosäuren iterativ durch Cystein ersetzt. Im Anschluss werden diese Cysteinmutanten synthetisiert und die Bindungsisothermen mit bekannten Werten verglichen. Somit kann die Toleranz gegenüber einer Cysteinsubstitution abgeschätzt werden. Darüber hinaus werden Informationen über das Verhalten der unterschiedlichen Fragmente in der NCL sowie die resultierenden Ausbeuten erhalten. Da die selbstreinigende Peptidthioestersynthese und die Synthese der Cysteinylopeptide parallel betrieben werden kann, schien die Durchführung eines Cystein-Scans sinnvoll.

TE-	123456789101234567892012345678930123456789401234567895012345678960	Cys.-
Nr.: ID: Seq.:	SATPTAVALY NFAGEQPGDL A F K K G D V I T I L K K S D S Q N D W WTGRTNGKEG IFPANYVRVS	Nr.:
54	01:K _(Biotin) -SATPTAVALY NFAGEQPGDL-SR + CFKKGDVITI LKKSDSQNDW WTGRTNGKEG IFPANYVRVS H ₆	71
55	02:K _(Biotin) -SATPTAVALY NFAGEQPGDL A-SR + CKKGDVITI LKKSDSQNDW WTGRTNGKEG IFPANYVRVS H ₆	72
56	03:K _(Biotin) -SATPTAVALY NFAGEQPGDL AF-SR + CKGDVITI LKKSDSQNDW WTGRTNGKEG IFPANYVRVS H ₆	73
57	04:K _(Biotin) -SATPTAVALY NFAGEQPGDL AFK-SR + CGDVITI LKKSDSQNDW WTGRTNGKEG IFPANYVRVS H ₆	74
58	05:K _(Biotin) -SATPTAVALY NFAGEQPGDL AFKK-SR + CDVITI LKKSDSQNDW WTGRTNGKEG IFPANYVRVS H ₆	75
59	06:K _(Biotin) -SATPTAVALY NFAGEQPGDL AFKKG-SR + CVITI LKKSDSQNDW WTGRTNGKEG IFPANYVRVS H ₆	76
60	07:K _(Biotin) -SATPTAVALY NFAGEQPGDL AFKKGDV-SR + CTI LKKSDSQNDW WTGRTNGKEG IFPANYVRVS H ₆	77
61	08:K _(Biotin) -SATPTAVALY NFAGEQPGDL AFKKGDVI-SR + CI LKKSDSQNDW WTGRTNGKEG IFPANYVRVS H ₆	78
62	09:K _(Biotin) -SATPTAVALY NFAGEQPGDL AFKKGDVIT-SR + C LKKSDSQNDW WTGRTNGKEG IFPANYVRVS H ₆	79
63	10:K _(Biotin) -SATPTAVALY NFAGEQPGDL AFKKGDVITI-SR + CKKSDSQNDW WTGRTNGKEG IFPANYVRVS H ₆	80
64	11:K _(Biotin) -SATPTAVALY NFAGEQPGDL AFKKGDVITI L-SR + CKSDSQNDW WTGRTNGKEG IFPANYVRVS H ₆	81
65	12:K _(Biotin) -SATPTAVALY NFAGEQPGDL AFKKGDVITI LK-SR + CSDSQNDW WTGRTNGKEG IFPANYVRVS H ₆	82
66	13:K _(Biotin) -SATPTAVALY NFAGEQPGDL AFKKGDVITI LKK-SR + CDSQNDW WTGRTNGKEG IFPANYVRVS H ₆	83
67	14:K _(Biotin) -SATPTAVALY NFAGEQPGDL AFKKGDVITI LKKS-SR + CSQNDW WTGRTNGKEG IFPANYVRVS H ₆	84
68	15:K _(Biotin) -SATPTAVALY NFAGEQPGDL AFKKGDVITI LKKSDS-SR + CNDW WTGRTNGKEG IFPANYVRVS H ₆	85
69	16:K _(Biotin) -SATPTAVALY NFAGEQPGDL AFKKGDVITI LKKSDSQ-SR + CDW WTGRTNGKEG IFPANYVRVS H ₆	86
70	17:K _(Biotin) -SATPTAVALY NFAGEQPGDL AFKKGDVITI LKKSDSQN-SR + CW WTGRTNGKEG IFPANYVRVS H ₆	87

Abbildung 4.2: Analyse der Sequenz der SH3-Domäne von YSC84, mit den für einen Cystein-Scan notwendigen Peptidfragmenten R = Bzl, TE = Peptidthioester, Cys. = Cysteinylpeptid.

Dies wurde für die SH3-Domäne von YSC84 durchgeführt. Um möglichst gleichgroße Peptidfragmente zu erhalten, werden bei einem Cystein-Scan die Aminosäuren in der Mitte der Sequenz substituiert. Die 60 Aminosäuren lange Domäne wurde auf mögliche Substitutionsstellen –innerhalb der mittleren 20 Aminosäuren– analysiert (Abbildung 4.2). Zwischen der 21. und 39. Aminosäure wurden insgesamt 17 mögliche Ligationsstellen identifiziert. Drei denkbare Ligationsstellen (DV, DS, DW) wurden auf Grund von möglichen β -Nebenprodukten durch Asp-Thioester ausgelassen (Erklärung in Abschnitt 2.2.1, Seite 8). Aus dieser Analyse ergeben sich 17 unterschiedliche Peptidthioester (**54-70**) und 17 Cysteinylpeptide (**71-77**).

Die Oberflächensynthese der Cystein-Mutanten wurde nach Schema 4.1 auf Ni-NTA- Mikrotiterplatten (96 Kavitäten) versucht. Für die Immobilisierung wurden die Cysteinylpeptide C-terminal mit einem Hexahistidin-Anker versehen. Die Peptidthioester wurden N-terminal mit H-Lys(Biotin) modifiziert, um die Ausbeute über einen Meerrettich-Peroxidase-Streptavidin-Konjugat (HRP-SA) (engl. *Horseradish peroxidase*)-Assay photometrisch bestimmen zu können. Hierbei wird das Signal durch die Katalyse der Oxidation von Tetramethylbenzidin (TMB) mit Hilfe oberflächengebundener HRP-SA generiert. Bei erfolgreicher Immobilisierung und Ligation wird HRP-SA vom Ligationsprodukt an die Oberfläche rekrutiert. Nach dem Waschen verbleibt HRP-SA durch das Ligationsprodukt mit der Oberfläche verbunden. TMB wird dort durch H₂O₂ unter dem katalytischen Einfluss von HRP zu TMB²⁺ oxidiert. Die Absorption von TMB²⁺ kann unter sauren Bedingungen bei 450 nm ausgelesen werden.



Schema 4.1: **A:** Oberflächensynthese von SH3-Domänen mit anschließender Ausbeutebestimmung mittels HRP-SA Assay. Ni = Ni²⁺(NTA) **B:** Struktur des verwendeten Lys(Biotin) Bausteins im Zielpeptid. Bt = H-Lys(Biotin)-

Die Peptidthioester wurden mittels selbstreinigender Peptidthioestersynthese nach *Mende et al.* ohne HPLC-Reinigung hergestellt (Abschnitt 2.4.2, Seite 25).^[136] Die Cysteinylopeptide wurden als Rohprodukt verwendet, da nur das Peptid, welches *N*-terminal ein Cystein trägt (Volllängenpeptide), mit dem Peptidthioester reagieren kann. Eine Übersicht zu den nach Schema 2.9 erhaltenen Peptidthioester (**54-70**) kann Tabelle 4.1 sowie Abbildung 4.3 entnommen werden.

Tabelle 4.1: Übersicht über die synthetisierten Peptidthioester der YSC84 SH3-Domäne. Sequenzen sind in Abbildung 4.2 aufgeführt.

Nr. Mutante	Nr.	AS-Länge	Ausbeute ^[a]	Reinheit ^[b]	korrigierte Ausbeute ^[c]
01	54	21	45%	94%	42.3%
02	55	22	48%	72%	34.6%
03	56	23	33%	89%	29.4%
04	57	24	34%	97%	33.0%
05	58	25	23%	97%	22.3%
06	59	26	7%	83%	5.8%
07	60	28	14%	59%	8.3%
08	61	29	7%	87%	6.1%
09	62	30	17%	89%	15.1%
10	63	31	5%	90%	4.5%
11	64	32	7%	88%	6.2%
12	65	33	24%	46%	11.0%
13	66	34	10%	89%	8.9%
14	67	35	2%	90%	1.8%
15	68	37	2%	87%	1.7%
16	69	38	5%	94%	4.7%
17	70	39	--	--	--

[a] Ausbeuten der Rohprodukte durch Absorption bei 278 nm bestimmt. [b] Reinheiten bestimmt mittels HPLC bei 278 nm. [c] Resultierende Ausbeuten wurde als Produkt der Rohausbeuten und der Reinheit berechnet.

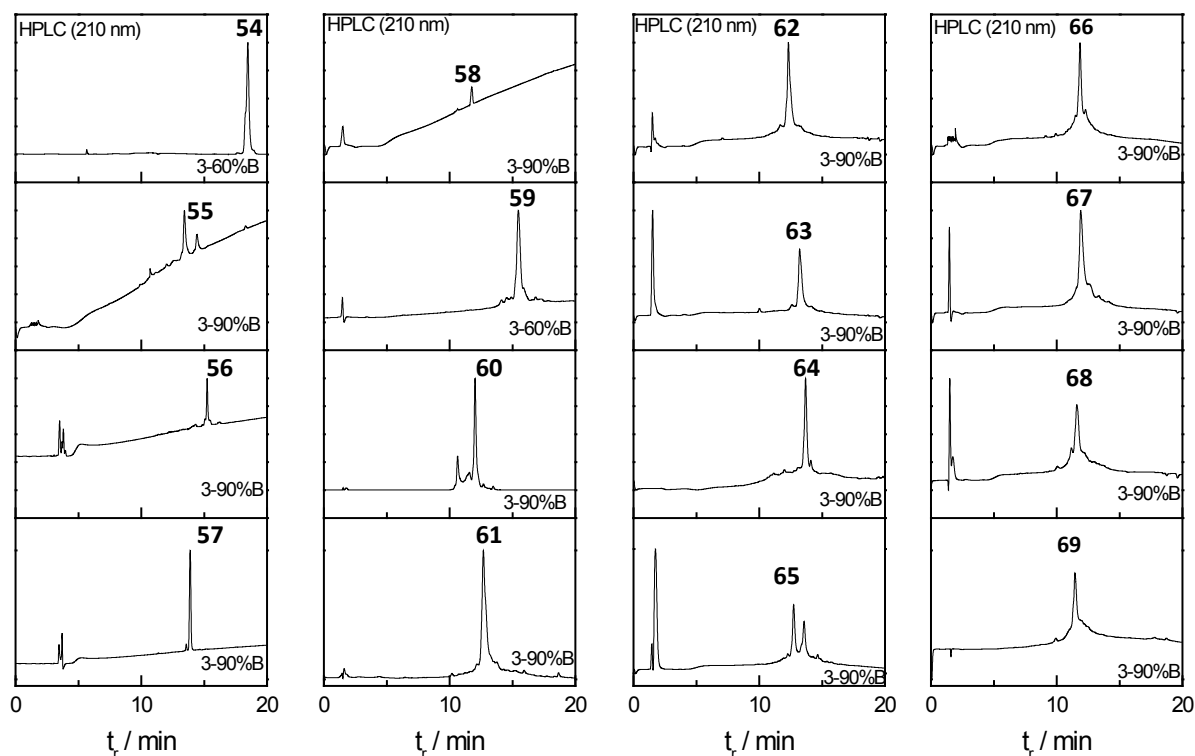


Abbildung 4.3 Erhaltenen HPLC-Chromatogramme der Thioester **54-69**, die nach Mende et al. durch Reaktionsführung entsprechend Schema 2.9 (Seite 25) erhalten wurden.^[207] Der Thioester **70** konnte nicht nachgewiesen werden.

Entsprechend Schema 2.9 (Seite 25) schließt sich an die Thiolyse ein intensives Waschen an, um die vom Harz getrennten Abbruchsequenzen zu entfernen. Die erhaltenen Reinheiten konnten durch die Zugabe von 1% TFA zu den Waschlösungen deutlich erhöht werden. Als Standardwaschprotokoll wurde zweimal je zehnmals mit Tetrahydrofuran (THF), Toluol, *N*-Methyl-2-pyrrolidon (NMP), CH_2Cl_2 mit TFE (3:1) und DMF gewaschen. Die mittlere Ausbeute an Rohprodukt betrug 18%, wobei die kürzeren Sequenzen höhere Ausbeuten zeigten. Die mittlere Reinheit lag dabei bei 84%. Die Thioester **55**, **60** und **65** blieben nach mehrmaligen Reinigungsversuchen bei einer Reinheit von unter 80%. Die erreichten Reinheiten scheinen nur geringfügig längenabhängig zu sein. Interessanterweise gelang die Synthese des 38 AS-langen Thioesters **84** in einer Reinheit von 94%. Dahingegen konnte, trotz mehrmaligen Versuchen, der 39 AS-lange Thioester **86** nicht erhalten werden. Die Ausbeuten und Reinheiten der entsprechenden Cysteinylpeptide **71-77** sind im Experimentellen Teil (Abschnitt 6.4.2, Tabelle 6.2, Seite 148) zu finden.

Zunächst wurde versucht, die Cysteinmutante 06 (D26C) **91** an der Oberfläche zu synthetisieren (Abbildung 4.4 A). Der HRP-SA Nachweis zeigte allerdings ein sehr hohes Hintergrundsignal für die Thioesterkontrolle, so dass der Erfolg der Ligation nicht eingeschätzt werden konnte. Das Signal, das nach der Ligation in Kavitäten der NCL

gemessen wurde, zeigte die gleiche Intensität wie in Kavitäten die lediglich Thioester enthielten. Vermutlich bindet der Thioester **59** unspezifische an der Ni-NTA-Polystyrolplatte. Bei Thioesterkonzentrationen von 100 μM in 0.1 M Na_2HPO_4 wurden Absorptionen von über drei gemessen. Es wurde daher versucht, die unspezifische Adsorption des Peptidthioesters zu unterdrücken. Zum einen wurden die verwendeten Ni-Platten vom Hersteller mit Rinderalbumin (engl. *bovine serum albumin*, Abk. BSA) behandelt, um unspezifische Bindung zu unterdrücken. Zu bedenken ist, dass in der Doktorarbeit von *Franziska Mende* eine Umesterung von Peptidthioestern auf das cysteinreiche BSA beschrieben wurde.^[207] Eine zweite Möglichkeit ist die Adsorption des Peptids an Polystyrol über hydrophobe Wechselwirkungen.^[158] Bezüglich der ersten Möglichkeit würde die Alkylierung der BSA Thiole eine Umesterung verhindern. Daher wurden die BSA-Cysteine in den Platten mit Iodacetamid und Iodessigsäure alkyliert und die Oberflächen auf unspezifische Bindung getestet. Außerdem wurde eine unmodifizierte Polystyrolplatte als Vergleich herangezogen (Abbildung 4.4 B). Es wurden steigende Konzentrationen von Thioester **88** (1-100 μM im Ligationspuffer: 0.1 M Na_2HPO_4 , 3 M Guanidiniumchlorid (GdmCl), 50 mM NaAscorbat (Asc.), 20 mM TCEP, pH 7.5) über 7 h in den Platten geschüttelt. Auf eine Zugabe von Thioladditiven wurde wegen der Affinität zu Ni^{2+} verzichtet.

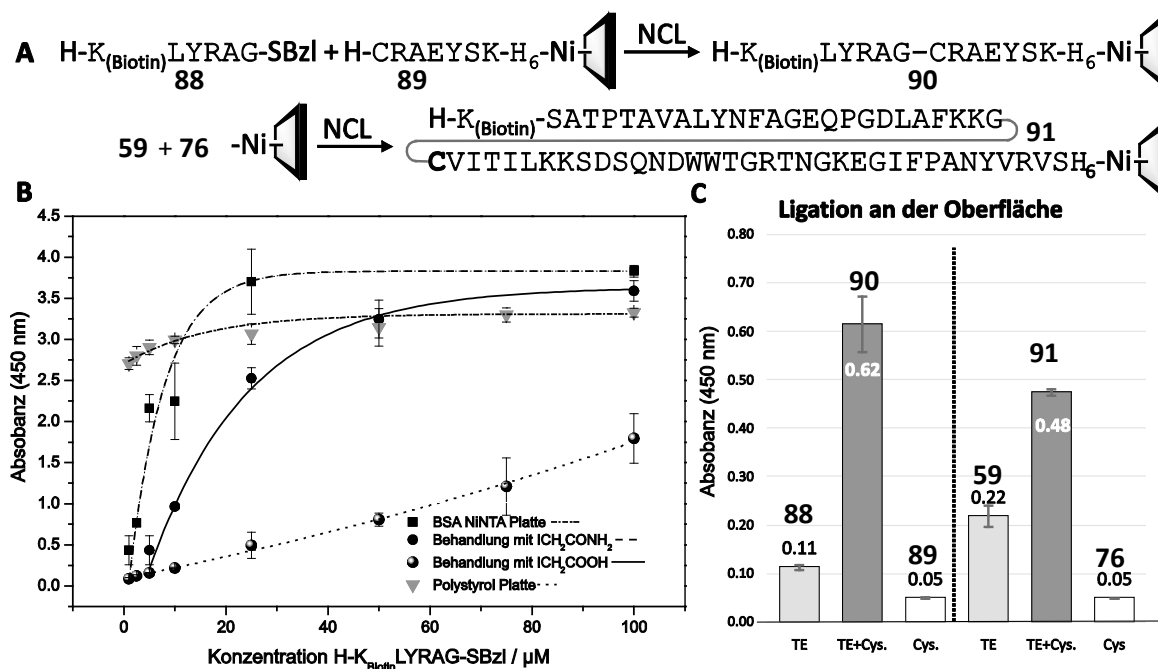


Abbildung 4.4 A: Testligation mit Modellpeptiden zur Evaluierung der Methodik, sowie Ligation der D26C Mutante der SH3-Domäne von YSC84. Platte = Ni-NTA modifizierte 96 Vertiefungs-Platte. **B:** Einfluss der Konzentrationen des Peptidthioesters **88** auf die unspezifische Adsorption gemessen in unterschiedlichen Platten. **C:** Auswertungen der Ligationsexperimente auf der Oberfläche. Absorptionen nach 1h TMB Oxidation durch oberflächengebundenes HRP-SA (vgl. Schema 4.1). Fehlerbalken entsprechen hier und in den folgenden Abbildungen der Standardabweichungen zwischen je drei Kavitäten. TE = Thioesterpeptid, Cys. = Cysteinylpeptid, Abs. = Absorption.

Ab Konzentrationen von 20 mM (Löslichkeitsgrenze)^[54a] verdrängt Thiophenol die His₆-Markierung von Ni-NTA-Komplex (Ergebnisse nicht aufgeführt). Anschließend wurden die Platten gewaschen und die Adsorptionen, wie oben beschrieben bestimmt (Abbildung 4.4 B). Dabei zeigte sich, dass die unbehandelte Polystyrolplatte schon ab einer Konzentration von 1 μ M große Mengen Thioester **88** band (Absorbanz > 2.7). Platten die mit BSA-Ni-NTA belegt waren, führten ebenfalls zu hohen Beladungen an Biotin (bei 5 μ M über 2). Alkylierten Platten zeigten bei niedrigen Konzentrationen wenig unspezifische Adsorption. Mit Iodacetamid behandelte Kavitäten führten bei Inkubation mit steigenden Konzentrationen an **88** zu einem starken nichtlinearen Anstieg der Biotinbeladung. Bei der Alkylierung mit Iodessigsäure stieg das Absorbanzsignal lediglich linear an.

Die Untersuchung zeigte, dass BSA die unspezifische Adsorption des Thioesters **88** nur bei niedrigen Konzentrationen ($< 5\mu$ M) verhindern kann. BSA ist in der Lage hydrophobe Substanzen (z.B. Fluoreszein) zu binden.^[208] Die Behandlung mit Iodessigsäure minimiert effektiver die hydrophobe Wechselwirkung mit der Oberfläche als die Anwendung von Iodacetamid. Dies kann mit Alkylierung von BSA erklärt werden.

Anschließend wurden die in Abbildung 4.4 A gezeigten Oberflächen-Ligationen durchgeführt. Eine Thioesterkonzentration von 100 μ M war erwünscht, um die Ligation zur Vollständigkeit zu bewegen. Diese Konzentration ist für die NCL eigentlich gering, da typischerweise Konzentration über 1 mM Verwendung finden. Allerdings lassen die Untersuchungen zu unspezifischer Adsorption die Vermutung zu, dass an der Oberfläche hohe effektive Molaritäten erzielt werden können. Darüber hinaus liegt der Thioester bei gänzlicher Immobilisierung des Cysteinylopeptids (9 pmol) in einem 1100-fachen Überschuss vor. Allerdings war das Hintergrundsignal, das durch die Thioesterkontrolle (**88** und **59**) ermittelt wurde, trotz vorheriger Behandlung mit Iodessigsäure, so hoch wie das Signal für die Ligationsmischung. Die Thioesterkonzentration wurde daher auf 5 μ M (55-facher Überschuss) reduziert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.4 C dargestellt. Die Thioesterkontrolle zeigte eine Signalintensität von 0.11 für **88** und 0.22 für **59**. Die Intensität für die Ligationsmischung **90** und **91** waren mit 0.62 und 0.48 deutlich höher. Somit war die Ligation an der Oberfläche zwar möglich, das Hintergrundsignal schien durch unspezifische Absorption aber zu hoch.

Als nächstes wurde der Einsatz von BSA oder *Roche Blocking Reagent* (RBR) im Ligationspuffer zur Unterdrückung der unspezifischen Bindung untersucht. RBR ist

eine PEG-basierte Substanz oder Substanzmischung deren Zusammensetzung vom Hersteller nicht bekannt gegeben wird. Eine Blockierung der Platte vor der Zugabe des Thioesters **88** mit BSA oder RBR, wie es in vielen Protokollen üblich ist, reduzierte die unspezifische Bindung kaum (Abbildung 4.5 A). Wenn 1 ma.% (Massenprozent) BSA oder 0.2 ma.% RBR zum Thioester im Ligationspuffer gegeben wurde, reduzierte sich die Menge des gebundenen Biotins deutlich auf 8% des Ausgangswertes bei BSA und auf 31% bei RBR. Die anschließende Oberflächenligation mit 100 μ M Thioester **88** zeigte, dass sich die unspezifische Adsorption effektiver mit RBR unterdrücken lässt (Abbildung 4.5 B). Außerdem war das Signal der Ligation (TE+Cys) höher als bei der Verwendung von BSA, was sich mit einer effektiven Reduktion der Thioester oder Cysteinylopeptid Konzentration durch Thiolaustausch oder Disulfidbildung mit BSA erklären lässt.

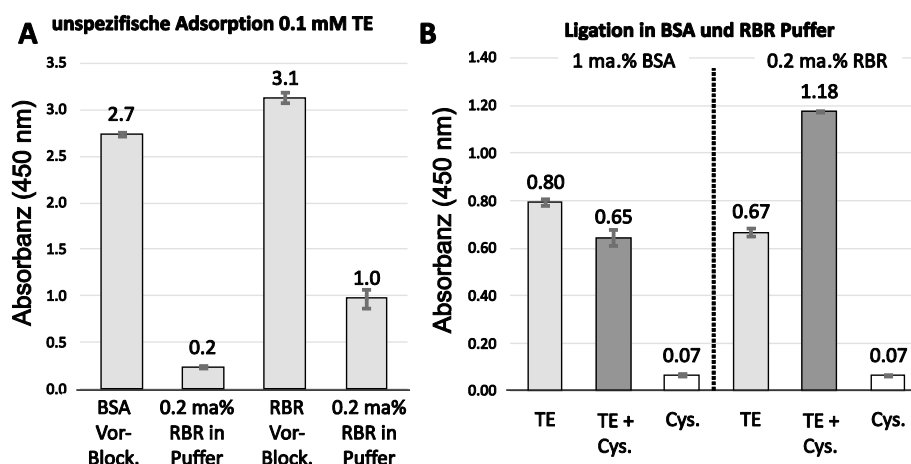
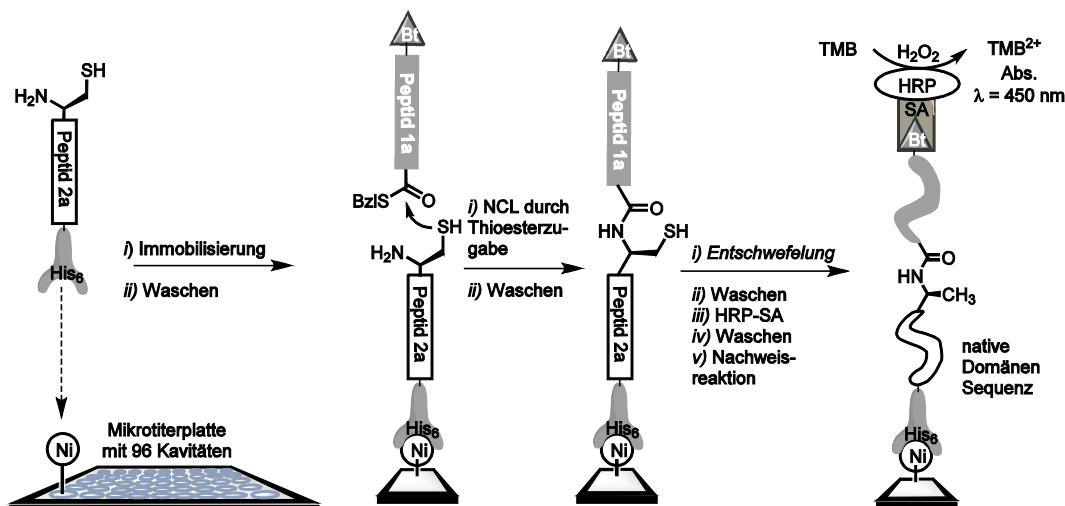


Abbildung 4.5 A: Reduzierung der unspezifischen Adsorption von Peptidthioester **88** durch die Verwendung von BSA ggü. RBR durch vorherige Blockierung (Vor-Block.) oder im Ligationspuffer. **B:** BSA oder RBR im Ligationspuffer bei der NCL zu **90** bei 100 μ M Konzentration von **88** (vgl. Abbildung 4.4).

Mit der dargestellten Methodik wäre eine Ligation aller 17 in Abbildung 4.2 dargestellten Cysteinmutanten mit anschließender Evaluierung ihrer Bindungseigenschaften möglich. Bevor die Herstellung aller 16 Cysteinmutanten auf der Oberfläche erprobt wurde, sollte überprüft werden ob die His₆-Ni-NTA-Verankerung gegenüber den Bedingungen der erweiterten NCL beständig ist. Durch intensives Waschen, Lagerung oder Behandlung mit Säure kann dieser Komplex ebenso aufgebrochen werden. Daher erschien die Untersuchung der His₆-Ni-NTA-Stabilität im Zuge der Entschwefelung von Cysteinmutanten zu nativen SH3-Domänen als sinnvoll.

4.1.2 Synthese der YSC84-SH3-Domäne mittels Entschwefelung

Wie in Abschnitt 2.2.3 dargestellt, erweitert die Ligations-Entschwefelungs-Strategie die Synthesemöglichkeiten für Proteine und Protein-Domänen erheblich. Um diese Methodik auch für die Synthese von Protein-Domänen auf der Oberfläche zu nutzen, wurde die in Schema 4.2 dargestellte Reaktionsfolge erprobt.



Schema 4.2: Synthese nativer Protein-Domänen durch Oberflächenentschwefelung nach der NCL unter Verwendung des His₆-Ni²⁺-NTA Immobilisierung. Die Ausbeute kann nach beiden Schritten bestimmt werden.

Es sollte nach der NCL das Peptid mit Reagenzien behandelt werden, wie sie für die metall-freie Entschwefelung für Cystein und Penicillamin bekannt sind.^[65] Dies ist im Wesentlichen die Kombination von TCEP und dem Radikalstarter VA-044 in Gegenwart von Thiolen wie Glutathion oder *tert*-Butylmercaptan. Um die Stabilität der His₆-Ni-NTA Bindung gegenüber den Bedingungen der Entschwefelung zu testen, wurden unterschiedliche Konzentrationen an TCEP und Thiolen gegenüber dem immobilisierten Peptid **90** überprüft (Abbildung 4.6 A). Das immobilisierte Peptid **90** lieferte eine Biotinbeladung, die durch eine mittlere Signalintensität von 1.08 im HRP-SA Assay gekennzeichnet war. Wurde das immobilisierte Peptid **90** typischen Bedingungen der radikalischen Entschwefelung (250 mM TCEP, 40 mM GSH und 20 mM VA-044 **11**, 40°C für 5 h) unterzogen reduzierte sich die Intensität auf 0.23. Eine Verringerung der TCEP und Thiolkonzentration um den Faktor 2 und 4 führte zu entsprechend weniger Verdrängung und somit zu Signalen von 0.32 und 0.83. Bei Verwendung von 50 mM TCEP sowie 20 mM *t*BuSH, was einem Fünftel der üblichen Konzentration für metall-freie Cysteinentschwefelungen entspricht, wurde innerhalb der Messgenauigkeit kein Peptid verdrängt (Abbildung 4.6 B). Die beiden letztgenannten Entschwefelungsexperimente wurden für eine Ausbeutenanalyse herangezogen.

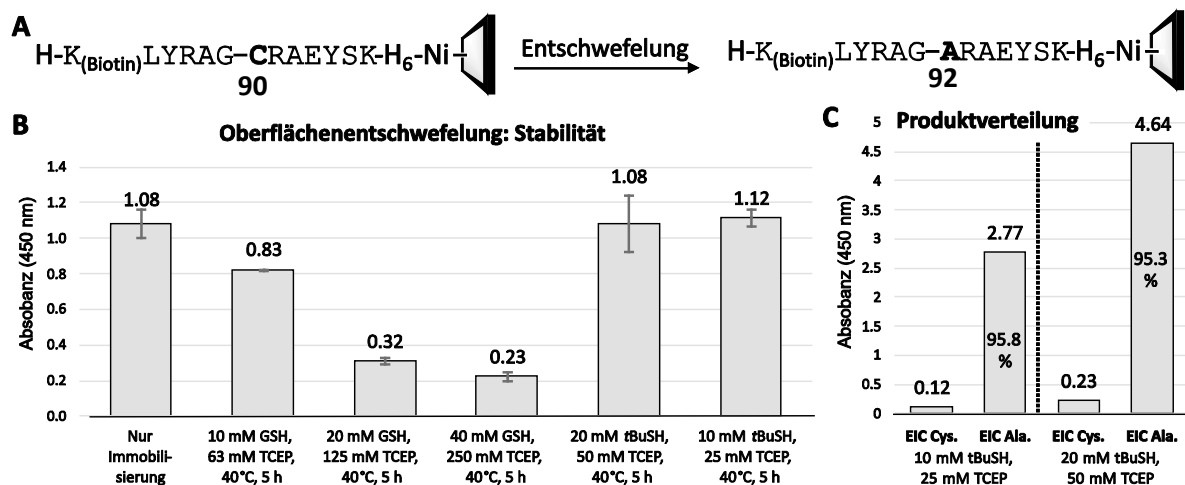


Abbildung 4.6 A: Stabilität des immobilisierten Peptids **90** gegenüber unterschiedlicher Konzentrationen an TCEP und Thiolen, jeweils mit 20 mM VA-044. Fehlerbalken sind die Standardabweichungen zwischen je drei Kavitäten. **B:** Mittels Nano-FT-ICR ermittelte Produktverteilung. EIC = Extracted Ion Count, Ala. = Alaninpeptid **92**.

Die Peptide wurden mit Hilfe einer 0.2 M Imidazol-Lösung bei pH 4 von der Oberfläche verdrängt und anschließend mittels Fourier-Transformation-Ionen-Cyclotron-Resonanz (FT-ICR) Massenspektrometer auf ihre Zusammensetzung untersucht. Dabei wurde das fünffach positiv geladenen Massensignal verwendet; für das Cysteinylpeptid **90** ($[M+5H]^{5+} = 519.456 \text{ m/z}$), für das Alaninpeptid **92** ($[M+5H]^{5+} = 513.062 \text{ m/z}$). Die Häufigkeit der jeweiligen Signale wurde mittels *extracted ion count* (EIC) ermittelt (Abbildung 4.6 C). Bei beiden Konzentrationen ergab sich eine Ausbeute von ca. 95%.

Als Nächstes wurde versucht, diese Ergebnisse auf die Synthese der SH3-Domäne von YSC84 **94** anzuwenden (Abbildung 4.7).

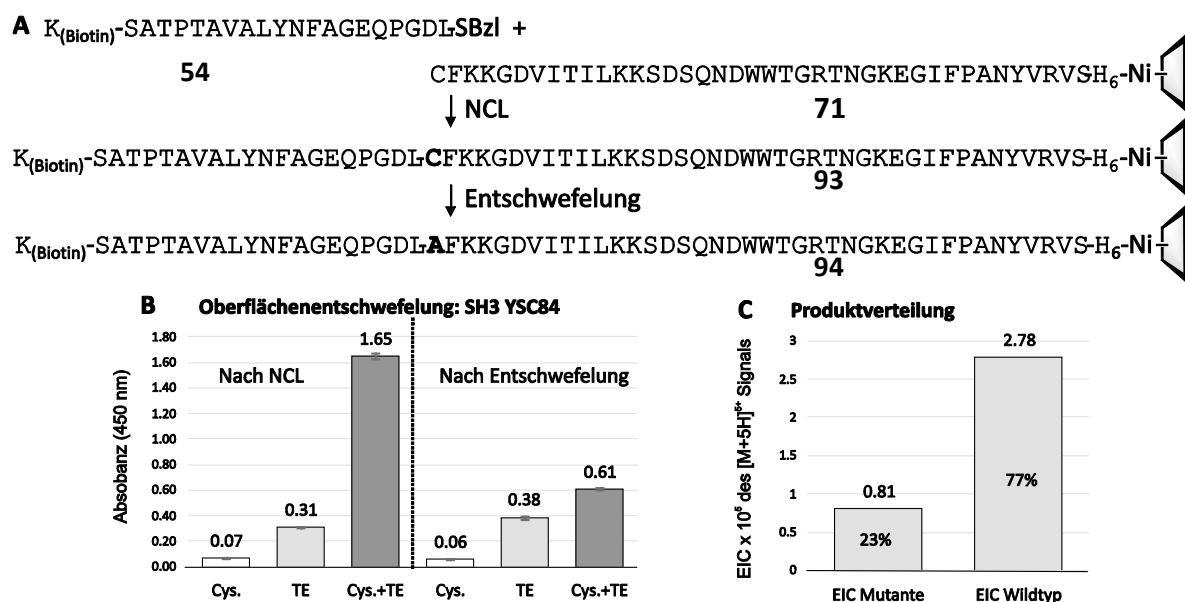


Abbildung 4.7: A: Reaktionsfolge zur Oberflächensynthese der SH3-Domäne von YSC84 **94** mittels NCL (48 h) und Entschwefelung (0.1 M Na₂HPO₄, 3 M GdmCl, 20 mM VA-044, 50 mM TCEP, 20 mM tBuSH, pH 6.5, 12 h 40°C). **B:** Ausbeuteanalyse durch den HRP-SA Assay, nach der NCL und nach der Entschwefelung. **C:** Mit Hilfe von Nano-FT-ICR ermittelte Produktverteilung von Cys. **93** und Ala. **94**.

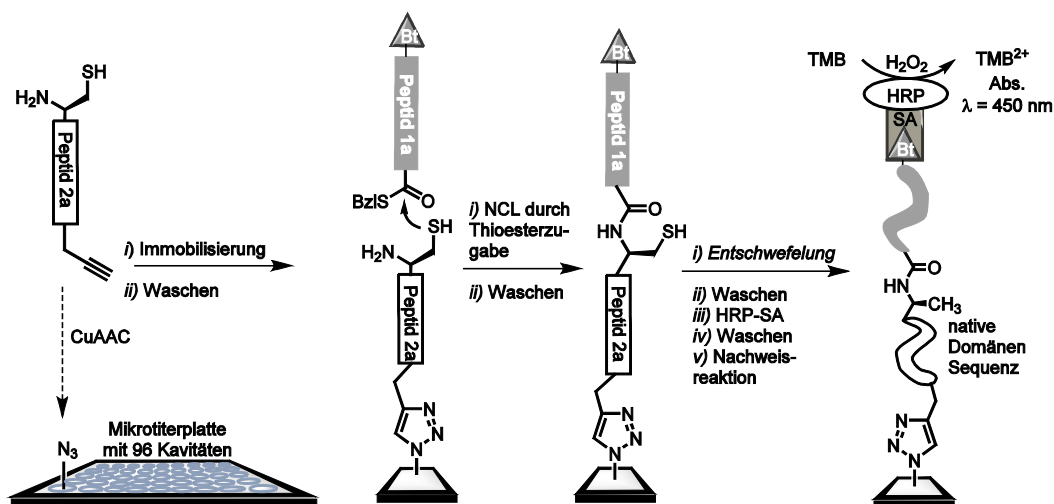
Dazu wurde Peptidthioester **54** mit dem Oberflächen-immobilisierten Cysteinylpeptid **71** in einer 96-Kavitäten-Mikrotiterplatte zur Reaktion gebracht. Anschließend wurde die erfolgreiche Ligation mittels HRP-SA-Assay überprüft. Trotzdem die relativ langsame Leu-Cys Verknüpfungsreaktion (quantitativer Umsatz ≥ 48 h)^[52] gewählt wurde, konnte eine hohe mittlere Absorbanz von 1.65 nach 48h Reaktionszeit erhalten werden, die dem Ligationsprodukt **93** zuzuordnen ist. Das Thioestersignal präsentierte eine gemittelte Absorbanz durch unspezifische Bindung von 0.31. Nach der Entschwefelung mit optimierten Pufferbedingungen (0.1 M Na₂HPO₄, 3 M GdmCl, 20 mM VA-044, 50 mM TCEP, 20 mM *t*BuSH, pH 6.5) über 12 Stunden bei 40°C, hatten die Vertiefungen mit Ligationsprodukt allerdings nur noch eine Absorbanz von 0.61 und die Kavitäten des Thioester noch 0.38. Dies legt nahe, dass trotz der Verwendung optimierter milderer Pufferbedingungen (geringe Menge TCEP und Thiol), das Ligationsprodukt zu 63% während der Entschwefelung verdrängt wurde. Nach gezielter Mobilisierung des Ligationsprodukts durch Imidazol-Lösung und anschließender Analyse mit Nano-FT-ICR konnte das Entschwefelungsprodukt **94** mit einer relativen Verteilung von 77% und die nicht entschwefelte Cysteinmutante **93** mit 23% gefunden werden (berechnet an Hand des EIC des [M+8H]⁸⁺ Massensignals beider Spezies). Dieses Ergebnis offenbart, dass die Methodik nicht für eine allgemeine Anwendung geeignet ist. Das vielversprechenden Ergebnisse der Synthese des Testpeptids **92** ließ sich nicht auf die Synthese des Zielproteins **94** übertragen.

4.1.3 Diskussion und Fazit

Die Struktur jedes Peptids beeinflusst die Zugänglichkeit der His₆-Tags und somit die Stabilität der His₆-Ni-NTA Bindung.^[209] Somit sind unterschiedliche und schwer zu prognostizierende Produktverluste selbst bei optimierten Entschwefelungsbedingungen zu erwarten. Da die Ni-NTA-Platten lediglich eine Beladung von 9 pmol/Kavität aufweisen, wäre ein Produktverlust schädlich für die Güte eines anschließenden Bindungsassay.^[210] Darüber hinaus war bei den optimierten Pufferbedingungen (mit wenig TCEP und Thiol) kein reproduzierbar vollständiger Umsatz zu dem gewünschten Produkt **94** möglich. Dies zeigt außerdem, dass auch bei Anwendung der Cystein-Scan-Technik nicht auf eine stabile Immobilisierung vertraut werden kann, da vermutlich Verdrängung des Produktes bei intensiver Waschung, Lagerung oder Entschwefelung stattfindet. Aus diesen Gründen bedarf es idealerweise einer kovalenten und chemoselektiven Immobilisierung die härteren Entschwefelungsbedingungen standhält.

4.2 Immobilisierung durch CuAAC für die Oberflächen-Ligation & -Entschwefelung

Eine Methode die eine kovalente chemoselektive Immobilisierung des Cysteinylopeptids ermöglicht, ist die kupferkatalysierte Alkin-Azid-Cycloaddition (CuAAC).^[176] Eine für die Herstellung von Protein-Domänen-Arrays mögliche Synthesestrategie, welche die CuAAC für die Immobilisierung nutzt, ist in Schema 4.4 dargestellt.

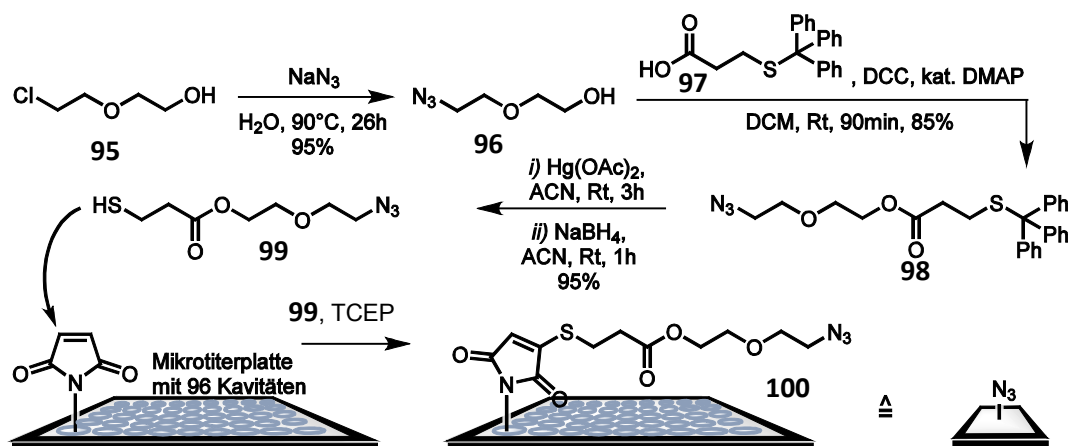


Schema 4.3: Synthese nativer Protein-Domänen durch Oberflächenentschwefelung nach der NCL unter Verwendung der CuAAC Immobilisierung, wobei Cysteinylopeptid 2a ein Alkin trägt und die Oberfläche Azid funktionalisiert ist.

4.2.1 Peptid-Verankerung auf Azid-funktionalisierten Mikrotiterplatten

Die Methode wurde derart konzipiert, dass Alkin-modifizierte Cysteinylopeptide auf einer Azid-funktionalisierten Oberfläche mittels CuAAC zur Reaktion gebracht werden können. Ein Azid auf der Oberfläche und die Alkinfunktion im Peptid bewirkt nach *Lin et al.* eine verbesserte Oberflächenimmobilisierung.^[161b] Anschließend kann durch Zugabe des Peptidthioesters die NCL durchgeführt werden. Eine Entschwefelung nach dem Waschen liefert die native Sequenz der gewünschten Domäne. Nach *Steinhagen et al.* kann die Immobilisierung und NCL auch simultan durchgeführt werden. Dies würde die Handhabung vereinfachen.^[189] In der Veröffentlichung wurde beschrieben, dass rekombinant erhaltene Thioester mit Cysteinylopeptiden umgesetzt wurden, welche C-terminal ein Propargylglycin trugen. Simultan reagierte dieses Alkin mit Azid-funktionalisierten PEGA-Harz und lieferte somit das immobilisierte Volllängenprotein.

Azid-funktionalisierte Mikrotiterplatten sind nicht kommerziell verfügbar, daher wurden Maleimid-funktionalisierte Platten verwendet. Diese wurden durch Verwendung des Linkers **99** funktionalisiert. Der Linker wurde in einer linearen dreistufigen Synthese mit einer Gesamtausbeute von 76% synthetisiert (Schema 4.4).



Schema 4.4: Synthese und Verwendung des Mercapto-Azid Linkers **99**, zur Azid-Funktionalisierung Maleimid modifizierter 96 Kavitäten Mikrotiterplatten. DCC = Dicyclohexylcarbodiimid, DMAP = Dimethylaminopyridin, Rt = Raumtemperatur.

Die Synthese erfolgt über Nukleophile Substitution des Chlorids in **95**.^[134a] Der so erhalten Azidoalkohol **96** wird mit *S*-Trityl-Mercaptopropionsäure **97** zu dem Ester **98** umgesetzt. Die Tritylschutzgruppe wurde mit Quecksilberacetat entfernt.^[211] Da das deblockierte Thiol als Disulfid erhalten wird, wurde reduktiv mit Natriumborhydrid aufgearbeitet. Nach chromatographischer Reinigung wurde der Azidothiol-Linker **99** erhalten. Nach Michael-Addition des Linkers **99** an die Maleimid-funktionalisierte Mikrotiterplatte, kann die Azid-funktionalisierte Platte **100** erhalten werden.

Für die Untersuchung der Thioladdition an Maleimid-modifizierte Mikrotiter-Platten wurde das Peptid H-K_(Biotin)LYRAGARAEYSKC-NH₂ (**102**) verwendet. Mit diesem Peptid wurde die Sättigungskonzentration und somit die maximale Beladung der Mikrotiterplatten getestet. Es wurde angenommen, dass das C-terminale Cystein quantitativ mit dem Maleimid auf der Oberfläche reagiert. Dazu wurden unterschiedliche Stoffmengen des Peptids in jeweils drei Kavitäten der Mikrotiterplatte gegeben (Abbildung 4.8 A). Die Auftragung der Messpunkte der gemessenen Absorbanz gegenüber der Stoffmenge des zugegebenen Biotin-Peptids zeigte, bis zu einer Absorbanz von 1.5, ein lineares Verhalten. Danach ($n > 150$ pmol) näherten sich die Messpunkte einem insgesamt hyperbolen Verlauf an. Der Hersteller gibt für die Beladung der Platten einen Wert von 150 pmol pro Kavität an. Bei quantitativer Beladung ist somit bei $n > 150$ pmol die Sättigung erreicht. Mit den ersten fünf Messpunkten im linearen Bereich wurden mit Hilfe von linearer Regression eine lineare Gleichung erhalten (Abbildung 4.8 A).

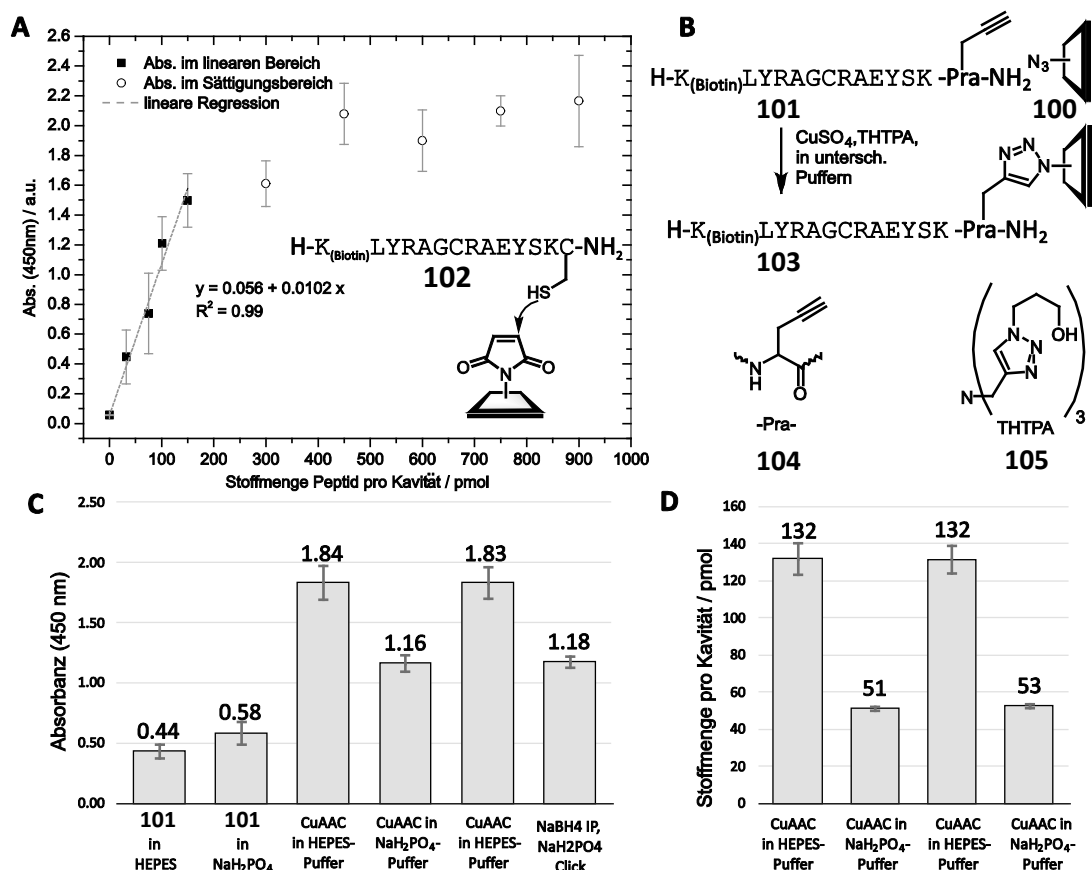


Abbildung 4.8 A: Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen von Cysteinylpeptid **102** zu einer Maleimid funktionalisierten Mikrotiterplatte und linear Regression zur Ermittlung der gebundenen Stoffmenge. **B:** CuAAC-Reaktion des Alkinpeptids **101** mit einer Azid-funktionalisierten Platte **100**. **C:** HRP-SA Analyse der Azid-Funktionalisierung in Funktionalisierung-Puffer (Funkt. Puffer: 0.1 M NaH₂PO₄, pH 6.5; 20 mM TCEP oder 20 mM NaBH₄) und anschließende CuAAC in zwei CuAAC Puffern (HEPES oder NaH₂PO₄). **D:** Mit Gleichung (Gl. 1) bestimmte Stoffmengen pro Kavität.

Mit dieser ließ sich dann nach Gleichung (Gl. 1) die Stoffmenge in Abhängigkeit der Absorbanz bestimmen.

$$n(\text{Peptid in Kavität}) = \frac{(\text{Absorbanz} - 0.056)}{0.0102} \text{ pmol, für Absorbanz.} \leq 1.6 \quad (\text{Gl. 1})$$

Dies ließ auch vermuten, dass die Thiol-Addition an die Maleimidplatten quantitativ im TCEP Additionsbuffer (0.1 M NaH₂PO₄, 20 mM TCEP, pH 6.5) verlief.

Das Linkermolekül **99** neigte dazu –während der Lagerung– das symmetrische Disulfid zu bilden. Als Disulfid kann keine Reaktion mit den Maleimid-funktionalisierten Platten stattfinden. Zusätzlich war die Wasserlöslichkeit geringer. Aus diesem Grund wurde das Linkermolekül in einem reduzierenden Puffer zur Platte gegeben. Da der Erfolg der Linker-Addition nicht direkt geprüft werden konnte, wurde er indirekt über eine folgende CuAAC-Reaktion bestätigt. Darüber hinaus wurde ein weiterer Puffer für die Funktionalisierung, sowie zwei Puffer für die CuAAC evaluiert. Bezüglich der Addition wurde der Einfluss von TCEP und NaBH₄ im Puffersystem verglichen. Außerdem

wurden zwei Puffer für die CuAAC-Immobilisierung getestet. Zunächst wurde der Azidothiol-Linker **99** im TCEP- und NaBH_4 -Additionspuffer (20 mM, 20 mM NaBH_4 , 0.1 M NaH_2PO_4 , pH 6.5) zur Platte gegeben. Anschließend wurde eine Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach dem Waschen wurden mit Ac-Cys-OH nicht reagierte Maleimidgruppen blockiert (63 mM, Additionspuffer 2: 0.1 M NaH_2PO_4 , 20 mM NaCNBH_3 , 4 mM TCEP, pH 6.5). Für die folgende CuAAC wurden zwei Puffer getestet, (1.) der 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)-Puffer, der von der Arbeitsgruppe *Beck-Sickinger*^[177] eingesetzt wurde, sowie (2.) ein in der Gruppe *Seitz* üblicher Phosphat-Puffer: (1.) HEPES-Puffer (20 mM HEPES, 1 μM CuSO_4 , 2 μM Tris(3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amin (THPTA), 1 mM TCEP, 0.5 mM NaCl, pH 8) und (2.) Phosphat-Puffer (0.1 M NaH_2PO_4 , 20 mM NaCNBH_3 , 1 μM CuSO_4 , 2 μM THPTA, 10 μM NaAsc, pH 8). Es wurde das C-terminal L-Propargylglycin (Pra) tragende Peptid **101** in diesen beiden Puffern gelöst und auf in TCEP- oder NaBH_4 -Puffer Azido-funktionalisierte sowie in nicht-funktionalisierte Kavitäten **100** gegeben. Die Analyse zeigte, dass das Peptid in blockierten nicht-funktionalisierten Kavitäten unspezifisch gebunden wurde (Abbildung 4.8 C). Die Absorbanzwerte für die unspezifische Bindung wurden von dem Signal für die CuAAC-Reaktion subtrahiert. Anschließend wurden mit Gl. 1 die Stoffmengen pro Vertiefung bestimmt (Abbildung 4.8 D). Die beiden Additionspuffer zeigen keine Unterschiede, da nur signifikante Stoffmengenunterschiede bei unterschiedlicher CuAAC-Puffern zu beobachten waren. Die Ausbeuten der CuAAC waren dagegen stark von der Pufferzusammensetzung abhängig. Während im HEPES-Puffer die Ausbeute 132 pmol (88%) betrug, lieferte die CuAAC im Phosphatpuffer lediglich eine Ausbeute von 52 pmol (35%).

4.2.2 Oberflächen-Ligation und -Entschwefelung

Daraufhin wurde eine simultane CuAAC-Immobilisierung und Ligation untersucht. Es wurden zwei Äquivalente Thioester **88** mit dem Cysteinylpeptid **106** auf einer Azido-funktionalisierten Platte **100** im HEPES-Puffer umgesetzt (Abbildung 4.9 A). In der Bachelorarbeit von *Michael Krumrey* wurde gezeigt, dass bei einer Kupfersulfat-Konzentration von über 1 μM die NCL inhibiert wird (Abbildung 6.2, Seite 156).^[212] Diese Beobachtung kann durch Koordination des Cysteinylpeptids mit dem Kupferzentrum erklärt werden. Cysteinylpeptide sind bekannte Liganden für $\text{Cu}^+/\text{Cu}^{2+}$.^[213] Bei Verwendung von 0.5 μM CuSO_4 und 1 μM THPTA im Puffer mit 200 μM Thioester **88** und 100 μM Cysteinylpeptid **106** war die simultane Ligation und Immobilisierung, mit einer nach Gl. 1 berechneten Stoffmenge von 69 pmol/Kavität und einer Ausbeute von 46%

erfolgreich (Abbildung 4.9 B). Anschließende Behandlung mit dem Entschwefelungspuffer (3 M GdmCl, 0.1 M NaH₂PO₄, 200 mM VA-044, 250 mM TCEP, 80mM *t*BuSH, pH 6.8, 16 h bei 40°C) und Bestimmung des oberflächengebundenen Biotins offenbarte, dass etwa 15 pmol Ligationsprodukt **107** während der Entschwefelung von der Oberfläche verdrängt wurden.

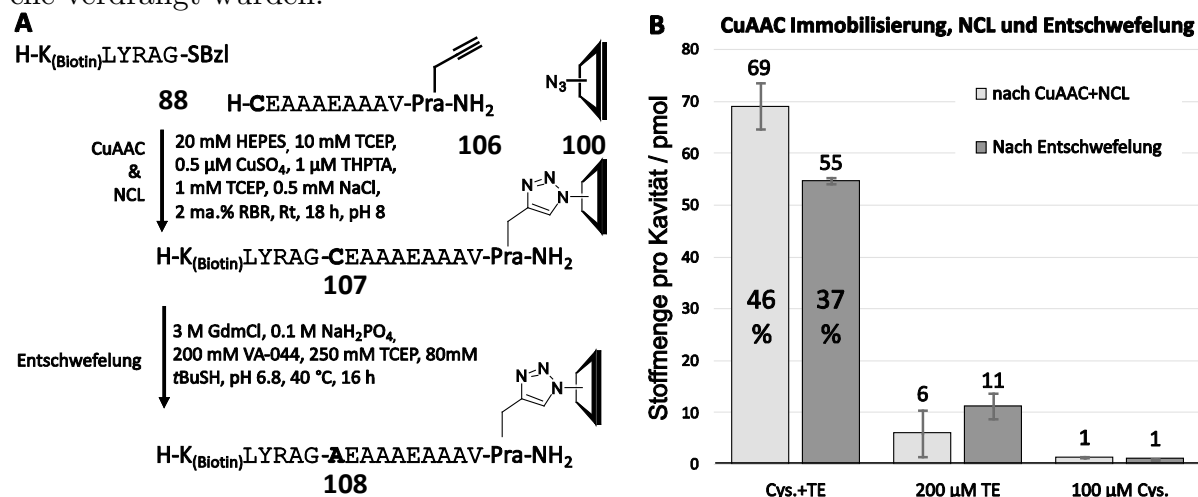


Abbildung 4.9 A: Simultane CuAAC-Immobilisierung und NCL mit anschließender Entschwefelung auf der Oberfläche. **B:** Nach CuAAC/NCL sowie nach der Entschwefelung bestimmte Ausbeuten mittels HRP-SA-Assay.

Die Ligation und Entschwefelung ist demnach gelungen, allerdings verwundert der Verlust an Ligationsprodukt während der Entschwefelung. Vermutlich fand die NCL auch mit dem unspezifisch gebundenen Peptid **106** statt oder ein gebildetes Ligationsprodukt wurde unspezifisch adsorbiert. Diese unspezifische Bindung könnte durch die harschen Entschwefelungsbedingungen abgelöst worden sein. Trotzdem wäre die Stoffmenge von 55 pmol pro Kavität (37% Ausbeute) für anschließende Bindungsmessungen noch ausreichend hoch. Die Ni-NTA-Platten haben eine maximale Beladung von 9 pmol/Kavität, die GSH-Platten eine von 0.3 pmol/Kavität).^[210]

Mit diesen Resultaten wurde die Übertragung der Methode auf die Synthese der SH3-Domäne des YSC84 Proteins vorgenommen. Das C-terminal Propargylglycin funktionalisierte Cysteinylopeptid **109** wurde mittels Fmoc-SPPS am Rinkamid-Harz synthetisiert. Es wurde **109** (100 μM in 12 Kavitäten) simultan mit dem Thioester **54** (200 μM) über eine NCL umgesetzt. Simultan wurde der C-Terminus mit der Azido-Platte via CuAAC verbunden (Abbildung 4.10 A). Drei benachbarte Kavitäten wurden als Gruppe zusammengefasst (NCL1-4). Bei der Ausbeutebestimmung nach NCL und Entschwefelung mittels HRP-SA-Analyse präsentierte sich eine breite Verteilung der Stoffmenge zwischen den Kavitäten und Gruppen. Die Ausbeute für das Produkt **111** schwankte zwischen 14 ± 6.9 pmol (9% Ausbeute) und 106 ± 5.8 pmol (71%). Die

Verteilung innerhalb einer Gruppe kann an Hand der relativ großen Fehlerbalken abgeschätzt werden (Abbildung 4.10 B). Dieses Ergebnis ist verwunderlich, da alle Kavitäten gleichbehandelt wurden. Die großen Unterschiede in den Produktausbeuten traten auch bei wiederholter Durchführung auf.

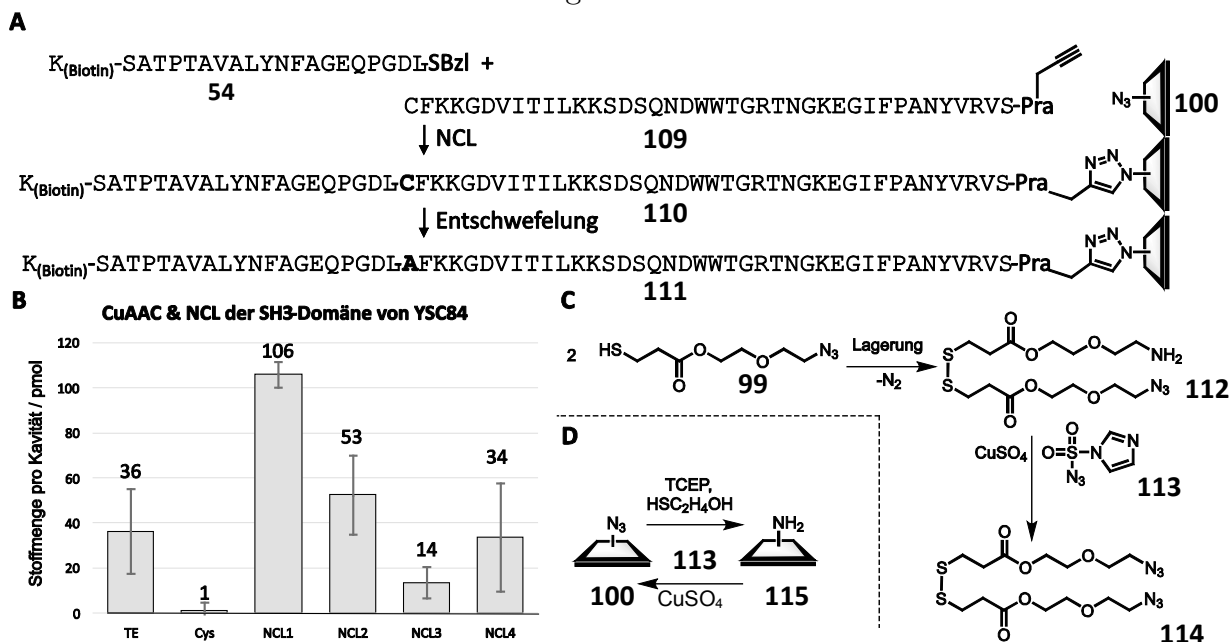


Abbildung 4.10 A: Oberflächenimmobilisierung und NCL, sowie anschließende Entschwefelung der SH3-Domäne des YSC84 Proteins. **B:** Mittels HRP-SA und Gl.1 berechneten Stoffmengen pro Kavität nach NCL und Entschwefelung. NCL1-4 wurden alle unter den gleichen Bedingungen zeitgleich in der gleichen Mikrotiterplatte durchgeführt. **C:** Beobachtete Dimerisierung des Linkermoleküls **99**, wobei eine Azidofunktion zum Amin reduziert wird. Diese lässt sich mit dem Azid **113** wieder zu der Linkervorstufe **114** umsetzen. **D:** Mögliche Reduktion des Azids auf der Oberfläche durch TCEP und Thiole, sowie mögliche Regenerierung mittels Azid **113**.

Um festzustellen was zu diesen unterschiedlichen Ausbeuten führte, wurde der Azidothiol-Linker analysiert. Nach einem Monat Lagerung wurde dieser mittels NMR-Spektroskopie und HPLC-MS untersucht. Dabei zeigte sich, dass eine quantitative Umwandlung zu dem Disulfid **112** stattgefunden hatte (Abbildung 4.10 C). Das Massenspektrum (Abbildung 6.1, Seite 153) und das ^1H -NMR Spektrum offenbarte (Abbildung 10.1, Seite 225), dass ein Azid zum Amin reduziert wurde. Ein weiterer indirekter Strukturbeweis dafür wurde dadurch erbracht, dass durch die Behandlung von **112** mit 1H-Imidazol-1-sulfonyl-Azid **113** und katalytischen Mengen CuSO_4 , die Diazido-Verbindung **114** massenspektroskopisch nachgewiesen wurde. Dieser Reaktionsverlauf (Abbildung 4.10 C) kann durch Stickstoffeliminierung bei gleichzeitiger Oxidation zweier Thiole zum Disulfid erklärt werden. Die Oxidationsstufen der Thiole ändert sich dabei von -2 auf -1 und die des Alkan-gebundenen Stickstoffs von -1 auf -3. Die Reduktion von Aziden zu Aminen unter Oxidation von Thiolen ist in der Literatur bekannt. Arylazide werden quantitativ bei physiologischen pH-Wert von Dithiolen z.B. Dithiothreitol (DTT), aber auch langsamer von Monothiolen (2-Mercaptoethanol und GSH)

reduziert.^[214] Darüber hinaus ist auch bekannt, dass Phosphine allgemein Azide reduzieren. Diese Reaktion wird als Staudinger-Reduktion bezeichnet.^[215] Es ist darüber hinaus beschrieben worden, dass TCEP im Speziellen ebenfalls Azide reduziert.^[216] Somit können das verwendete 2-Mercaptoethanol oder TCEP (während der Blockierung der Platten, der Azido-Funktionalisierung oder NCL/Immobilisierung) bestehende Azidogruppen in Amine reduziert haben (Abbildung 4.10 D). Nach Behandlung mit Azidothiol-Linker **99** und anschließender Blockierung mit 20 mM 2-Mercaptoethanol (0.1 M NaH₂PO₄, 20 mM Na(CN)BH₃, 1 mM TCEP, pH 8) wurden je drei Kavitäten mit dem Azid-erzeugenden Reagenz **113** behandelt. Danach wurde eine CuAAC mit Peptid **101** in allen sechs Kavitäten durchgeführt. Die drei Kavitäten, welche vorher mit Azid **113** behandelt wurden, zeigten eine 2.9-fach höhere Stoffmenge 87 ± 11 pmol (58% Ausbeute) im Vergleich zu den drei Kavitäten ohne Azid-Reaktivierung mit 29 ± 1 pmol (19%) (Abbildung 6.3, Seite 157). Dies bestätigt indirekt, dass während der Funktionalisierung und/oder Blockierung, die Azido-Funktionen an der Oberfläche zu Aminen reduziert wurden.

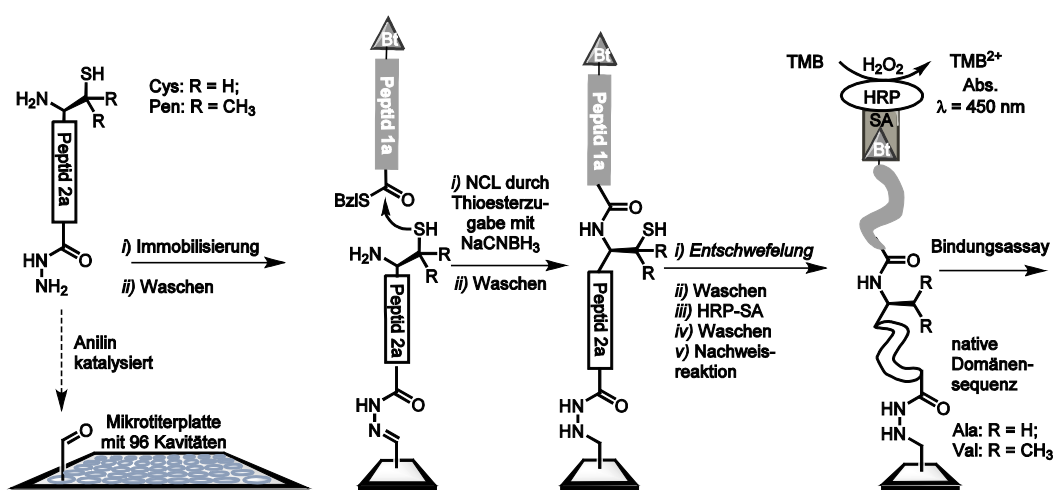
4.2.3 Diskussion und Fazit

Die Oberflächenimmobilisierung von *C*-terminalen Peptid-Alkinen durch CuAAC mit Azido-funktionalisierten Mikrotiterplatten ist prinzipiell gelungen. Die Azidogruppen waren anfällig gegenüber einer Reduktion zum Amin auf den Platten **100** und auch bei der Lagerung des Linkers **99**. Dieser Sachverhalt zusammen mit der geringen Reproduzierbarkeit, bzw. großen Differenz zwischen einzelnen Kavitäten bei der NCL, ließ die Methode der CuAAC-Immobilisierung als ungeeignet erscheinen. Eine Oberflächensynthese die eine uniforme Verteilung von Protein-Domänen liefert ist notwendig für die folgenden Bindungsmessungen, da gleiche Domänenkonzentrationen für die Oberflächen-Fluoreszenzsättigungsanalyse nötig sind. Eine alternative Immobilisierungsmethode die kovalent und verlässlich ist, wurde daher gesucht.

4.3 Oberflächensynthese und -analyse von Hefe-SH3-Domänen via Hydrazonligation

Wie in Abschnitt 4.1 und 4.2 beschrieben, waren die Ergebnisse der Ligations- sowie Entschwefelungsversuche auf Ni-NTA und Azid-funktionalisierten Oberflächen, nicht für die Synthese uniform verteilter Protein-Domänen geeignet. Es wurde daher innerhalb der bioorthogonalen Verknüpfungsmethoden nach einer verlässlichen, schnellen sowie stabilen Immobilisierungsreaktion gesucht. Des Weiteren sollte sich die benötigte reaktive Gruppe leicht in das zu immobilisierende Peptid einbauen lassen. Übersichtsartikel die bioorthogonale Reaktionen behandeln sind hier zu finden.^[217] Innerhalb der realisierbaren Techniken erschien die Hydrazonligation, die Reaktion von Hydrazinen oder Hydraziden mit Aldehyden oder Ketonen, am geeignetsten, da sie schnell und selektiv ist. C-terminale Peptidhydrazide lassen sich nach *Fang et al.* relativ einfach am Chlorotrityl-Harz herstellen (Schema 2.6 E, Seite 15).^[100] Die funktionelle Gruppe des Hydrazids ist im Vergleich zum Peptidamid nur um zwei Atome erweitert ($-\text{CONH}_2 \rightarrow -\text{CON}_2\text{H}_3$). Der zweite Reaktionspartner (Aldehyd oder Keton) lässt sich überdies durch eine Vielzahl an Reaktionen generieren (z.B. Oxidation von Alkoholen).

Daher wurde im Anschluss die Immobilisierung und Synthese von Hydrazid-terminierten SH3-Domänen auf Aldehyd-funktionalisierten Mikrotiterplatten versucht. Die erprobte Reaktionsfolge, um die gewünschten Synthesen zu realisieren ist in Schema 4.5 zu sehen. Am Anfang standen Hefe-SH3-Domänen zur Erarbeitung der Methodik im Fokus. Danach waren humane phosphorylierte SH3-Domänen das Ziel der Forschung (Abschnitt 4.4 und 4.5).



Schema 4.5: Oberflächensynthese von Protein-Domänen immobilisiert mit Hilfe der Hydrazonligation. Während der NCL kann dem Puffer NaCNBH₃ zugesetzt werden, um die reversible Hydrazonbindung in ein stabiles Alkylhydrazid zu verwandeln. Anschließend Entschwefelung liefert die native Domänensequenz, die für Bindungsmessungen zur Verfügung steht.

Es wurden *N*-Cysteinyl- oder Penicillamin-Peptidhydrazide auf Aldehyd-funktionalisierten Mikrotiterplatten mittels Anilin-katalysierter Hydrazonligation immobilisiert. Bei der anschließenden NCL wird dem Ligationspuffer NaCNBH₃ beigemischt. Dies wird aus zweierlei Gründen getan, erstens wird der Disulfidbindung vorgebeugt und zweitens wird die reversible Hydrazonbindung zu einer stabileren Alkylhydrazidbindung reduziert. Das so erhaltene Ligationsprodukt kann anschließend entschweifelt werden, um die native Alanin- und Valinsequenz zu erhalten.

4.3.1 Erforschung der Hydrazonligation für die Immobilisierung

N-Cysteinylpeptidhydrazide können mit Aldehyden, neben der gewünschten *C*-terminalen Hydrazonligation, theoretisch auch *N*-terminal unter Bildung von Thiazolidinen reagieren. Um die Chemoselektivität der Hydrazonknüpfung zu testen, wurde das Cysteinylpeptidhydrazid **116** mit zwei Äquivalenten Valeraldehyd **117** zur Reaktion gebracht (0.1 M NH₄OAc, pH 4). Die Produktverteilung wurde mittels UPLC-MS (*ultra pressure liquid chromatography*) analysiert (Abbildung 4.11 A). Die molekularen Massen der möglichen Produkte **118** und **119** sind identisch. Zwei identische Massenspektren bei unterschiedlichen Retentionszeiten wurden gefunden und zunächst an Hand der vermuteten Polaritäten zugeordnet. Die Struktur **118** wurde als weniger retendierend eingeschätzt (**118**: NH, N₂H₃ ggü. **119**: N₂H, NH₂, SH). Nach 20 min Reaktionszeit wurde über UPLC-MS Analyse 40% des vermuteten Hydrazonprodukts **119** nachgewiesen (Abbildung 4.11 B).

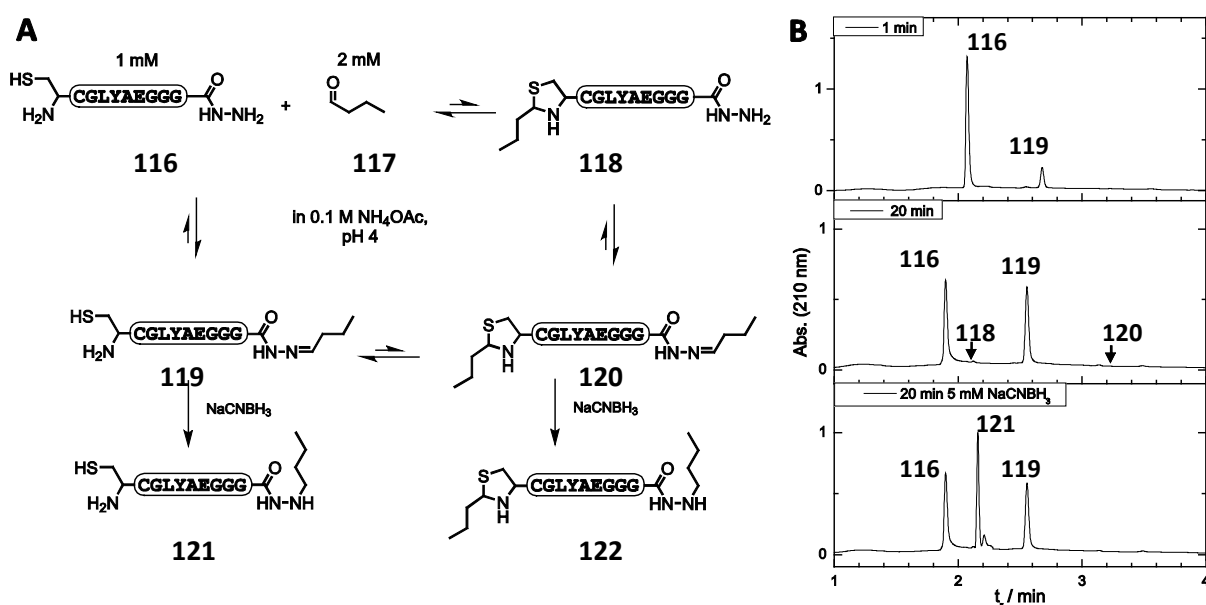
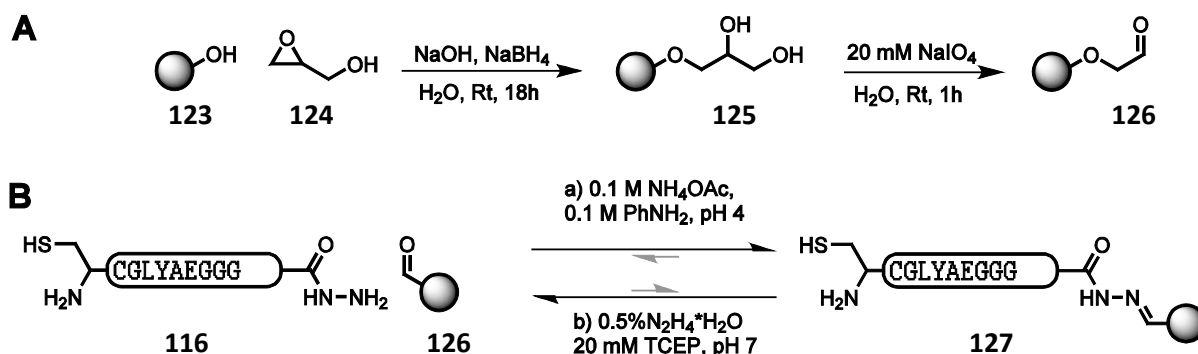


Abbildung 4.11 A: Reaktion von *N*-Cysteinylpeptidhydrazid **116** mit zwei Äquivalenten Valeraldehyd **117** im Ammoniumchloridpuffer pH 4. Es sind mögliche Produkte in ihrem erwarteten Gleichgewicht aufgeführt. **B:** UPLC-MS Chromatogramme nach unterschiedlichen Zeiten mit an Hand ihrer Massen zugeordneten Verbindungen.

Im weiteren Verlauf blieb die Produktverteilung konstant. Daher wurde angenommen, dass das Gleichgewicht erreicht wurde. Eine höhere Ausbeute wurde vermutlich durch das ebenfalls involvierte Gleichgewicht der Homo-Aldoladdition des Valeraldehyds **117** verhindert. Ein Hinweis für diese These ist, dass bei Verwendung von Isobutyraldehyd 85% Ausbeute erhalten wurde (Abschnitt 6.6.2, Seite 159). Bei den oben genannten Bedingungen kommt es am Rande der Nachweisgrenze zu Bildung des vermuteten Thiazolidinhydrazids **118** ($< 0.3\%$, EIC) und des Thiazolidinhydrazons **120** ($< 0.4\%$). Nachfolgende Zugabe von 5 mM NaCNBH_3 transformierte die Hydrazonbindung des Peptids **119** in das Alkylhydrazid **121** (Abbildung 4.11 B). Durch die Reduktion wurde ein Strukturhinweis erbracht. Der Peak ($t_r = 2.56$ min) der dem Peptid **119** zugeordnet wurde, verschwand nach 60 min und ein neuer Peak ($t_r = 2.16$ min) mit nahezu gleicher Signal-Intensität wurde gebildet. Das Massenspektrum dieses Peaks konnte der Molekularmasse des *N*-Alkylhydrazid **121** zugeordnet werden, dass nach 1 h Reduktion vollständig bildet wurde. Das Hydrazon **119** wurde dem Gleichgewicht durch Reduktion entzogen, dies führte zu einer Ausbeute des Produktes **121** von 70 %. Das mögliche Produkt **122** wurde nicht nachgewiesen. Die unerwünschte *N*-Thiazolidinbildung findet demnach nur im geringen Maße statt. Die Produktverteilung ist vermutlich stark pH-Wert abhängig. *Kallen* hat für die Reaktion von Cystein mit Formaldehyd den Angriff des Amins auf das Carbonylkohlenstoffatom als geschwindigkeitsbestimmenden Schritt ermittelt.^[218] Da das *N*-Amin von Peptid **116** bei pH 4 zu einem sehr großen Teil protoniert vorliegt, spielt die Thiazolidinbildung nur eine untergeordnete Rolle.

Als nächstes wurde analysiert, ob eine quantitative Immobilisierung auf eine Oberfläche möglich ist. Es wurde sich hierbei der Reversibilität der Hydrazonbindung bedient. Das Verhalten des Peptids **116** mit Aldehyd-modifizierte Agarosekugeln war dabei im Fokus.



Schema 4.6 A: Synthese der Aldehyd-funktionalisierten Agarosekugeln **126** nach Guisan.^[219] **B:** Reversible Immobilisierung des *N*-Cysteinylpeptids **116** auf Aldehyd-Agarosekugeln. Das Gleichgewicht lässt sich durch die Wahl der Reaktionsbedingungen einstellen.

Die Aldehyd-funktionalisierten Agarose-Kugeln wurden nach *Guisan* hergestellt.^[219] Dafür wurden kommerzielle Agarosekugeln **123** (4B Sepharose) mit Glycidol (**124**) in basischer wässriger Lösung für 18 Stunden geschüttelt (Schema 4.6 A). Anschließend wurden die addierten vicinalen Diole im Polymer **125** mit Natriumperiodat oxidiert, wobei die Aldehyd-modifizierten Agarosekugeln **126** erhalten wurden. Im Anschluss wurde die quantitative Immobilisierung mit Hilfe der Reversibilität der Hydrazonbindung erprobt (Schema 4.6 B). Das Peptid **116** (100 nmol, 100 μ M) wurde im Konjugationspuffer (0.1 M NH_4OAc , 0.1 M PhNH_2 , pH 4) auf die Agarosekugeln **126** gegeben, wobei sich das immobilisierte Hydrazon **127** bildet. Der Fortschritt der Reaktion wurde mittels UPLC-MS überwacht (Abbildung 4.12 A).

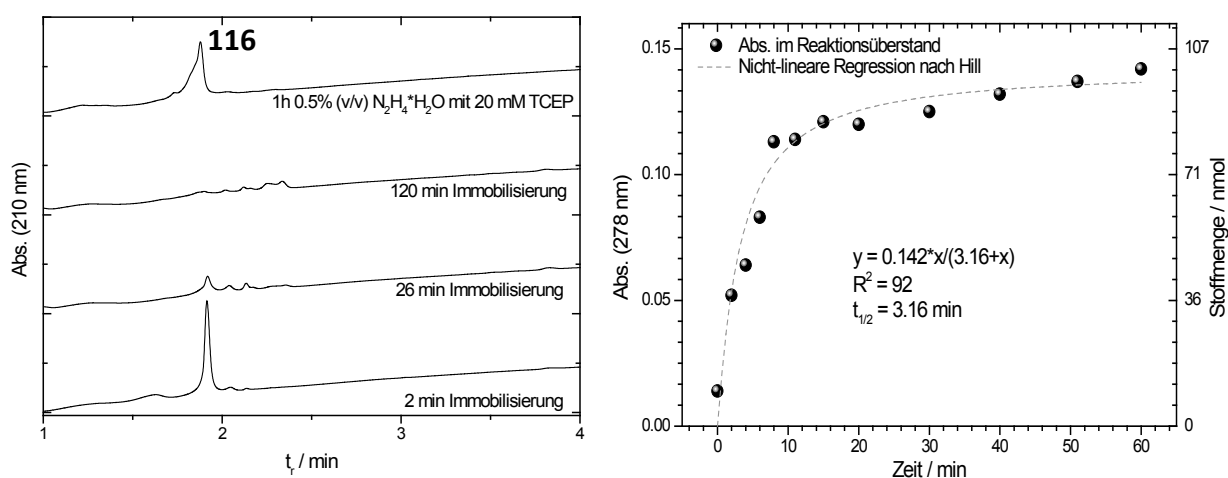


Abbildung 4.12 A: UPLC-MS Analyse der Reaktion in Schema 4.6 B. **B:** Zeitlicher Verlauf der Absorption im Überstand nach der Zugabe von 0.5 vol.% Hydrazinhydrat. Die Konzentration des Peptids **116** wurde mittels der Tyrosinabsorption bestimmt.

Nach 120 min war das Peptid nicht mehr zu beobachten und es wurde von einer vollständigen Immobilisierung ausgegangen. Um dies zu überprüfen wurde daraufhin der Überstand entfernt, die Kugeln gewaschen und mit einer wässrigen Lösung aus 0.5 vol.% Hydrazinhydrat und 20 mM TCEP behandelt (Schema 4.6 B). Das Peptid war im Überstand nachweisbar (Abbildung 4.12 A). Außerdem konnte durch Messung der Absorption des Überstands die Kinetik der Peptid-Ablösung abgeschätzt werden (Abbildung 4.12 B). Das Massenspektrum und die Retentionszeit (t_r) des im Überstand gefundenen Peptids entsprach dem Ausgangspeptid **116** (Abbildung 4.12 A). Die zu unterschiedlichen Zeitpunkten gemessenen Absorptionswerte wurden mittels nichtlinearer Regression an einen Hill-Kurvenverlauf angenähert. Dabei wurde eine Halbwertszeit ($t_{1/2}$) von 3.16 min für die Trennung vom Träger ermittelt. Darüber hinaus wurde die Stoffmenge in Lösung berechnet. Nach 60 min Ablösung befanden sich 87 nmol Peptid (87%) in Lösung.

4.3.2 Herstellung und Verwendung Aldehyd-funktionalisierter Mikrotiterplatten

Aldehyd-funktionalisierte Mikrotiterplatten sind kommerziell nur in durchsichtiger Form verfügbar. Für die Bindungsmessungen sind Platten aus schwarzen nicht-reflektierenden Material notwendig, da die Ligandenbindung fluorimetrisch ausgelesen werden soll. Die Verwendung von schwarzen Maleimid-Mikrotiterplatten mit 96 Kavitäten erschien daher sinnvoll. Michael-Addition von DTT (0.1 M) über 30 min im Additions-puffer (vgl. Seite 52) sollte das Diol **128** (Abbildung 4.13 A) liefern. Anschließend wurden die vicinalen Diole mit 20 mM NaIO₄ in Wasser zum Aldehyd **129** oxidiert. Die Funktionalisierung wurde daraufhin an Hand der Synthese des Peptids **133** getestet (Abbildung 4.13 B).

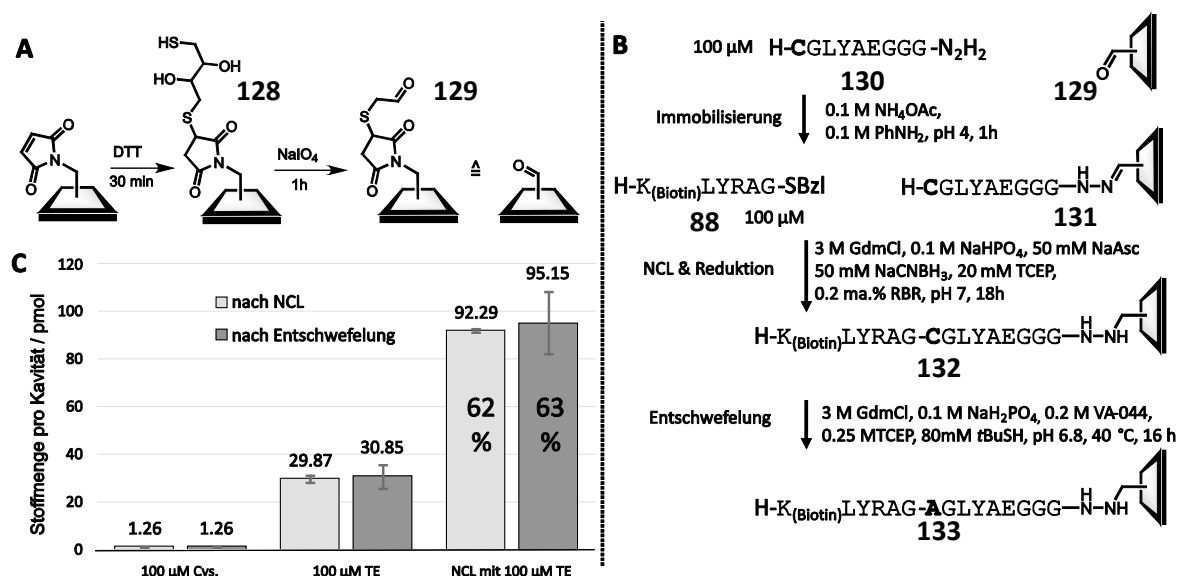


Abbildung 4.13 A: Aldehyd-Funktionalisierung von Maleimid-Mikrotiterplatten mit Hilfe von DTT und anschließender Oxidation durch NaIO₄. **B:** Immobilisierung, Ligation und Entschwefelung zur Synthese des Testpeptids **133** auf Aldehyd-funktionalisierten Platten **129**. **C:** Mittels HRP-SA Analyse berechnete (Gl. 1) Ergebnisse nach der NCL und nach der Entschwefelung während der Synthese von Testpeptid **133**.

Die Immobilisierung des Cysteinylpeptidhydrazid **130** mit Aldehyd-funktionalisierten Kavitäten **129**, müsste das Hydrazon **131** ergeben. Darauf folgend wurde Thioester **88** im Ligationspuffer 2 (0.1 M Na₂HPO₄, 3 M GdmCl 50 mM NaCHBH₃ 50 mM MesNa, 50 mM NaAsc, 20 mM TCEP, 1 ma.% RBR, pH 7.5) zugegeben und die Mischung wurde 18 Stunden geschüttelt. Nach einer Stoffmengenbestimmung mittels HRP-SA wurde die Entschwefelung 16 Stunden lang bei 40°C durchgeführt. Die HRP-SA-Analyse mit Berechnung der Stoffmenge nach Gl. 1 ergab, dass die NCL zu einer Beladung von 92 ± 1 pmol führte (62% Ausbeute bezogen auf 150 pmol maximal, vgl. Abschnitt 4.2.1). Nach der Entschwefelung zeigte sich eine ähnliche Stoffmenge von 95 ± 13 pmol (63%, Abbildung 4.13 B).

Bei der Synthese der SH3-Domäne von YSC84 konnten diese Ergebnisse nicht in der gleichen Güte reproduziert werden; 11 ± 2 pmol (7%) Ligationsprodukt wurde nachgewiesen. Zur Klärung wurde geprüft, ob der Maleimid-Aldehyd **129** während der Immobilisierung oder Lagerung Nebenreaktionen unterliegt. Dazu wurde Maleimid mit DTT zu dem Thioether **134** umgesetzt und anschließende Oxidation mit NaIO_4 ergab Aldehyd **135**. Die Produkte konnten mittels HPLC-MS nachgewiesen werden (Abbildung 4.14).

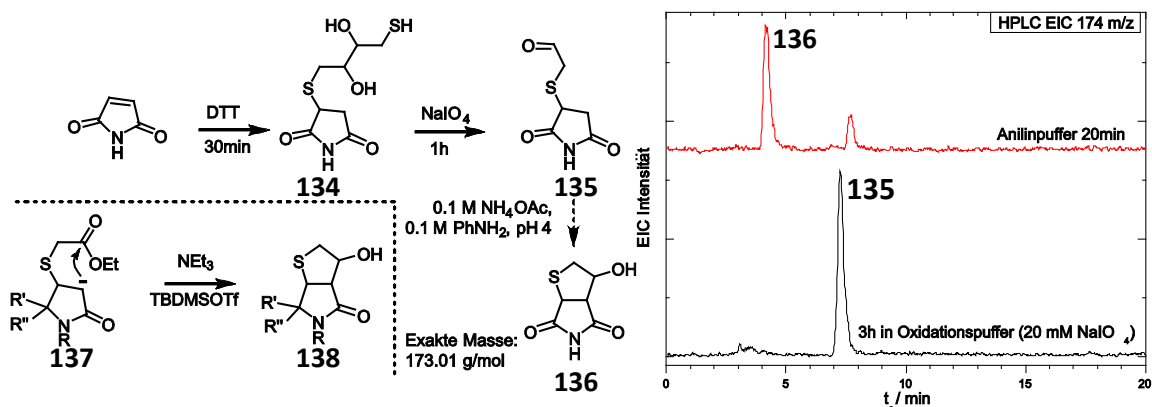
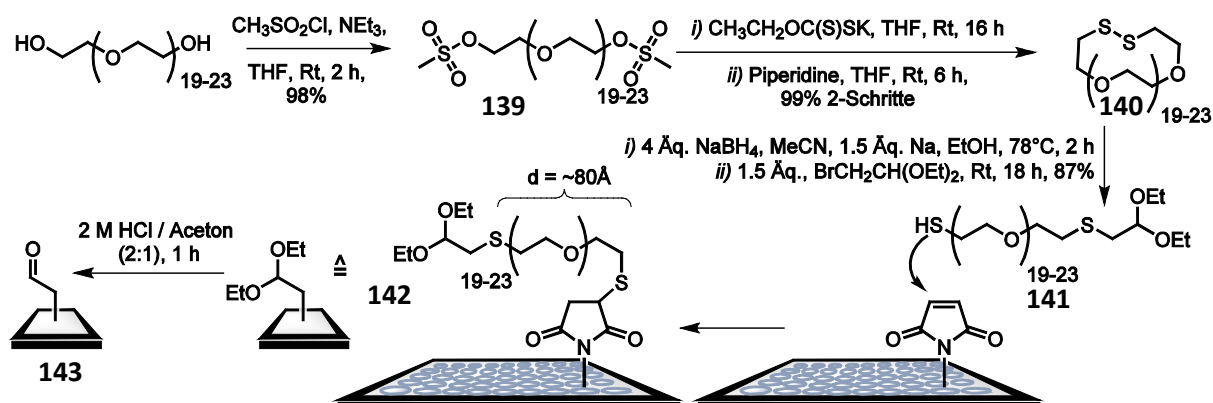


Abbildung 4.14: HPLC-MS Untersuchung der möglichen Nebenreaktion der Bildung des Bizyklus **136**.

Das Produkt **135** wurde in dem Konjugationspuffer geschüttelt. Nach 20 min Reaktionszeit wurde über HPLC-MS Analyse eine neue Spezies mit $m/z = 174$ m/z nachgewiesen. Diese könnte dem Produkt **135** $[\text{M}+\text{H}]^+ = 174.01$ m/z sowie einem möglichen Nebenprodukt **136** zugeordnet werden. Die Arbeitsgruppe *Liebscher* hat über ein ähnliches Produkt berichtet.^[220] Hierbei unterlag das Additionsprodukt von Thioessigsäureester mit 1,5-Dihydropyrolidon einer intramolekularen Aldoladdition des Pyrolidon-Enolats **137** zu dem Bizyklus **138**. Der vorgeschlagene Mechanismus ähnelt dabei einer säurekatalysierten Dieckmann-Kondensation. Analog wäre diese Reaktionsfolge bei der Bildung von **136** denkbar. Dafür spricht, dass der neue Peak bei einer Retentionszeit von 4 min eluiert, somit früher als das Produkt **135** ($t_r = 7.5$ min). Das Nebenprodukt **136** ist durch die Hydroxylgruppe im Vergleich zum Aldehyd **135** polarer und sollte daher auf einer C18 Säule früher eluiert werden. Eine Katalyse der beschriebenen Nebenreaktion durch Anilin ist denkbar, da die Carbonylaktivität durch Addition des Anilins ansteigt.

Um die beschriebene Nebenreaktion zu verhindern, wurde ein Linkersystem erdacht, indem Maleimid und Aldehyd durch eine Polyethylenglycol-Einheit getrennt sind. Der vergrößerte Abstand sollte die Bildung des Bizyklus verhindern und einen positiven Effekt auf die Bindungsmessungen ausüben (PEG Abstandshalter sorgen für Verhalten

ähnlich wie in Lösung)^[221]. Um die Mikrotiterplatten mit langkettig gebundenen Aldehydgruppen zu versehen, wurde der Mercapto-polyethylenglycol-acetal Linker **141** in Anlehnung an eine Synthesevorschrift von *Akiyama et al.* synthetisiert (Schema 4.7).^[222]



Schema 4.7: Synthese und Anwendung des Mercapto-polyethylenglycol-acetal Linkers **141** zur Aldehyd-Funktionalisierung von schwarzen Maleimid 96-Kavitäten Mikrotiterplatten.

Zuerst wurde PEG1000 mit einem Überschuss Mesylchlorid zu dem Dimethansulfonat **139** umgesetzt. Anschließend wurden die Mesyl-Fluchtgruppen nukleophil durch Kalium-Xanthogenat substituiert und das entstandene Dithiocarbonat durch Piperidin zu einem PEG-Dithiol geöffnet. Dieses geht unter den basischen Bedingungen in das zyklische Disulfid **140** über. Nachfolgend wurde die Disulfidbindung mit NaBH_4 reduziert und ein Äquivalent Bromoacetaldehyddiethylacetal hinzugefügt, wodurch der Mercapto-polyethylenglycol-acetal Linker **141** in einer Gesamtausbeute von 84% gewonnen wurde. Zur Modifizierung der Mikrotiterplatten wurde 50 mM Linker **141** pro Kavität im Additonspuffer (0.1 M NaH_2PO_4 , 20 mM NaCNBH_3 , 4 mM TCEP, pH 6.5) in die Platte gegeben und es wurde eine Stunde geschüttelt. Nach dem Waschen mit Wasser wurden evtl. verbliebene Maleimid-Einheiten mit 0.1 M *N*-Acetylcystein im Additonspuffer 30 min blockiert. Nach dem Waschen wurde die Diethylacetalgruppe auf der Acetal-funktionalisierten Platte **142** mit einer Mischung aus wässriger 2 M HCl Lösung und Aceton (2:1) zum Aldehyd geöffnet. Mit dieser Reaktionsfolge wurde vor jeder Oberflächensynthese die Aldehyd-funktionalisierte Mikrotiterplatte **143** generiert.

4.3.3 Oberflächensynthese der SH3-Domänen von YSC84 und ABP1

Auf den Mikrotiterplatten **143** wurde versucht, nach Schema 4.5 zwei Hefe-SH3-Domänen auf der Oberfläche zu synthetisieren. Einerseits wurde die SH3-Domäne des YSC84-Proteins mittels Cysteinligation und anschließender Entschwefelung zur nativen Alaninsequenz hergestellt. Andererseits wurde die SH3-Domäne des *actin-binding protein* (ABP1) mittels Penicillamin-vermittelter NCL und nachfolgender Entschwefelung

zu Valin auf der Oberfläche generiert. Das ABP1-Protein ist hauptsächlich für die Organisation des Actin-Cytoskeletts verantwortlich.^[223]

Zunächst wurde die Synthese der YSC84-SH3-Domäne verfolgt. Beide Reaktionspartner wurden ohne HPLC-Reinigung verwendet. Der Thioester **54** wurde mittels selbstreinigender Peptidthioestersynthese (Abschnitt 2.4.2, Seite 25) mit einer Reinheit von 94% erhalten. Das *N*-Cysteinylpeptid H-CFKKGDVITILKKSDSQNDWWTGRITNGKEGIFPANYVRVS-N₂H₃ (**144**) hatte eine relativ hohe Reinheit des Rohproduktes von 92%. Immobilisierung auf Aldehyd-funktionalisierten Mikrotiterplatten **143** im Konjugationspuffer ergab das Hydrazon **145** (Abbildung 4.15 A). Darauf folgend wurde der 21 Aminosäuren lange Thioester **54** im Ligationspuffer 2 mit dem Cysteinylhydrazon **145** umgesetzt. Simultan zur Ligation wird die Hydrazonbindung zum Alkylhydrazid **149** durch das im Puffer vorhandene NaCHBH₃ reduziert (Abbildung 4.15 A). Nach einer Stoffmengenbestimmung mittels HRP-SA wurde die Thiolgruppe im Entschwefelungspuffer 2 (3 M GdmCl, 0.1 M NaH₂PO₄, 0.2 M VA-044, 0.25 M TCEP, 80mM *t*BuSH für *Cys* oder 80mM GSH für *Pen*, pH 6.8) über 16 Stunden lang bei 40°C entfernt, wobei vermutlich die native Sequenz der SH3-Domäne **151** erhalten wurde.

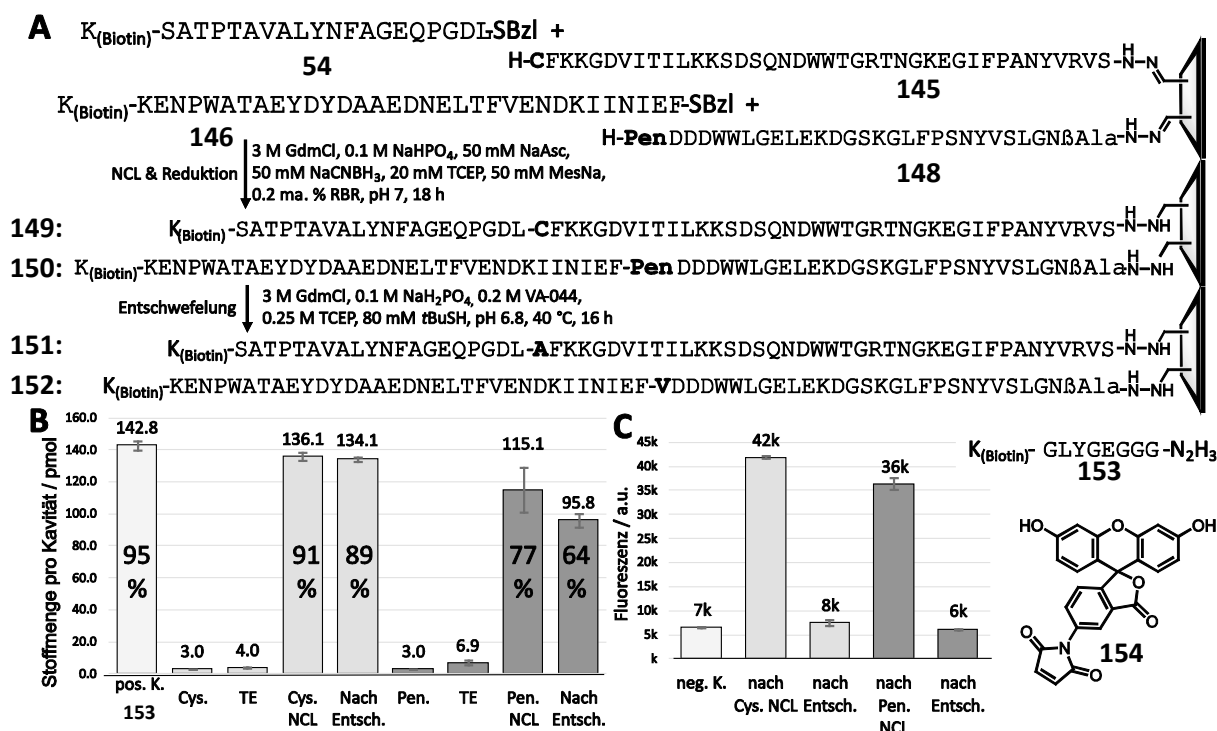


Abbildung 4.15 A: Oberflächenligation mit anschließender Entschwefelung der SH3-Domäne von YSC84 und ABP1. **B:** Ausbeutebestimmung mittels HRP-SA Assay mit positiver Kontrolle durch Peptid **153**. **C:** Test auf vorhandene Thiolgruppen auf der Oberfläche mittels Fluorescein-Maleimid Konjugat **154**. pos. K = positive Kontrolle, neg. K = negative Kontrolle, Peg. *N*-Penicillaminpeptid.

Analog wurde die SH3-Domäne von ABP1 aufgebaut, in dem das Peptid H-PenD-DDWWLGELEKDGSKGLFPSNYVSLGN β Ala-N₂H₃ (**147**) mit einer Reinheit des Rohprodukts von 77% unter Bildung des Hydrazons **148** immobilisiert wurde. Die NCL mit dem 34-Aminosäure Phe-Thioester **146** (Reinheit des Rohprodukts 83%) sollte das Ligationsprodukt **150** und die anschließende Entschwefelung die native Domäne **152** liefern. Parallel zu den *N*-Thiopeptidhydraziden **144** und **147** wurde das Kontrollpeptid **153** als positive Kontrolle im Konjugationspuffer immobilisiert. Die Ausbeutenanalyse zeigte für das Kontrollpeptid 143 pmol pro Kavität (95% Ausbeute im Vergleich zu maximal 150 pmol, Abbildung 4.15 B). Nach der NCL an Cystein konnte für das Peptid **149** eine Stoffmenge von 136 ± 3 pmol pro Vertiefung (91%) sowie für die durch Entschwefelung erhaltene native Sequenz **151** von 134 ± 1 pmol (89%) bestimmt werden. Bei der Ligation mit dem *N*-Penicillaminpeptid **148** wurde für das Produkt **150** eine Stoffmenge von 115 ± 14 pmol (77%) und nach der Entschwefelung von 96 ± 4 pmol (64%) bestimmt. Die Stoffmengen waren jeweils nach der Entschwefelung etwas geringer als nach der NCL, wobei die Unterschiede innerhalb der Messunsicherheit lagen. Unter Berücksichtigung der Reinheiten entsprechen die bestimmten Ausbeuten den zu erwartenden Maximalwerten (Cys: erwartet 89%, erhalten 87%; Pen: erwartet 64%, erhalten 64%). Generell waren die Signale, die aus unspezifischer Adsorption gebundener Thioester im Vergleich zu vorherigen Ligationen sehr gering. Dies lässt sich durch die Verwendung des Thioladditivs 2-Mercaptoethansulfonat-Natrium (MesNa) erklären. MesNa ist für einen schnellen Thiolaustausch bekannt.^[54a] Die entsprechenden MesNa-Thioester unterliegen vermutlich durch die erhöhte Polarität weniger der unspezifischen Adsorption. Um den Umsatz der Entschwefelungs-Reaktion zu überprüfen, wurden Kavitäten nach der Ligation (**149**, **150**) und nach der Entschwefelung (**151**, **152**) mit dem Maleimid-Fluoreszein Konjugat **154** im Additionsbuffer behandelt. Anschließend wurde nach dem Waschen im Plattenlesegerät die Fluoreszenz bestimmt (Abbildung 4.15 C). Dabei zeigte sich, dass die Ligationsprodukte vor der Entschwefelung eine hohe Fluoreszenz aufwiesen (42 kilo *arbitrary units* (a.u.), für **149** und 36 ka.u., für **150**). Nach der Entschwefelung lag der Fluoreszenzwert für das Alanin- (7.5 ka.u., **151**) und das Valin-Produkt (6 ka.u., **152**) im Bereich der negativen Kontrolle (6.6 ka.u.). Dies deutet auf eine nahezu quantitative Entschwefelung hin.

4.3.4 Analyse der Bindungsaffinitäten von YSC84 und ABP1 SH3-Domänen

Mit einer verlässlichen Oberflächensynthese der SH3-Domänen von YSC84 und ABP1 in der Hand wurde nun versucht das Bindungsverhalten dieser Proteine zu untersuchen.

Es wurden wie unter Abschnitt 4.3.3 beschrieben die Cys- oder Pen-Mutanten der SH3-Domänen von YSC84 und ABP1 auf der Oberfläche hergestellt (Abbildung 4.15). Auch wurden die Bindungsaffinitäten der A21C Mutante **149** und der V34Pen Mutante **150** zu 5/6-Carboxyfluorescein (FAM) markierten Peptiden bestimmt. Gemessen wurden die Peptide FAM-βAlaβAla-GTTNRGPPPLPPRA-NH₂ (**155**) des Hefeproteins ACF2 sowie FAM-βAlaβAla-RPKRRAPPPVPPKKP-NH₂ (**156**) des Proteins YIR003 für die mutierten sowie Wildtyp-Proteine. Die Bindungsaffinitäten für die nativen Sequenzen waren bekannt. Für die SH3-Domäne von YSC84 wurden von *Landgraf et al.* mittels SPR eine Affinität für **155** von $K_D = 1.1 \mu\text{M}$ ermittelt. Die SH3-Domäne von ABP1 band **156** mit einem $K_D = 0.1 \mu\text{M}$.^[181] Die ersten Bindungsanalysen, die noch auf Ni-NTA-Platten durchgeführt wurden, waren mit Problemen der unspezifischen Bindung der FAM-markierten Peptide behaftet (Ergebnisse nicht gezeigt). Neben der vorherig erwähnten hydrophoben Wechselwirkung (Seite 46 oben) gibt es auch noch die Möglichkeit der π - π -Stapelwechselwirkung, die besonders bei FAM-Peptiden verbreitet ist.^[224] Auch hier unterdrückte die Verwendung von 0.1 ma.% RBR die unspezifische Adsorption des Peptids (**155**) im phosphate-buffered saline (PBS)-Puffer (0.1 M Na₂HPO₄, 20 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 3 mM NaN₃) auf PS-Platten um den Faktor fünf. Die Bindungsisothermen wurden mittels Oberflächen-Fluoreszenzsättigung bestimmt. Dazu wurden in jeweils vier Kavitäten die gleichen Konzentrationen an FAM-markierten Peptid gegeben und dies mit steigenden Konzentrationen (0 - 50 μM) 30 min mit den Oberflächen-gebundenen Domänen inkubiert. Anschließend wurde mit PBS Puffer gewaschen und die Fluoreszenz mittels Plattenlesegerät bestimmt. Die Bindungskurven vor und nach der Entschwefelung wurden durch nichtlineare Regression der Messpunkte einem hyperbolen Kurvenverlauf (Gl. 2) angenähert.

$$Y = \frac{B_{\max} \cdot x}{K_D + x} + AuB \cdot x + HuB \quad \text{Gl. 2}$$

Y = Signal der Observablen, x = Konzentration des Liganden oder des Rezeptors (hier Peptid-Ligand), K_D = Gleichgewichts Bindungskonstante (hat die gleiche Einheit wie x), B_{\max} = das Maximum der spezifischen Bindung, AuB = Anstieg der unspezifischen Bindung, HuB = Hintergrund der unspezifischen Bindung.

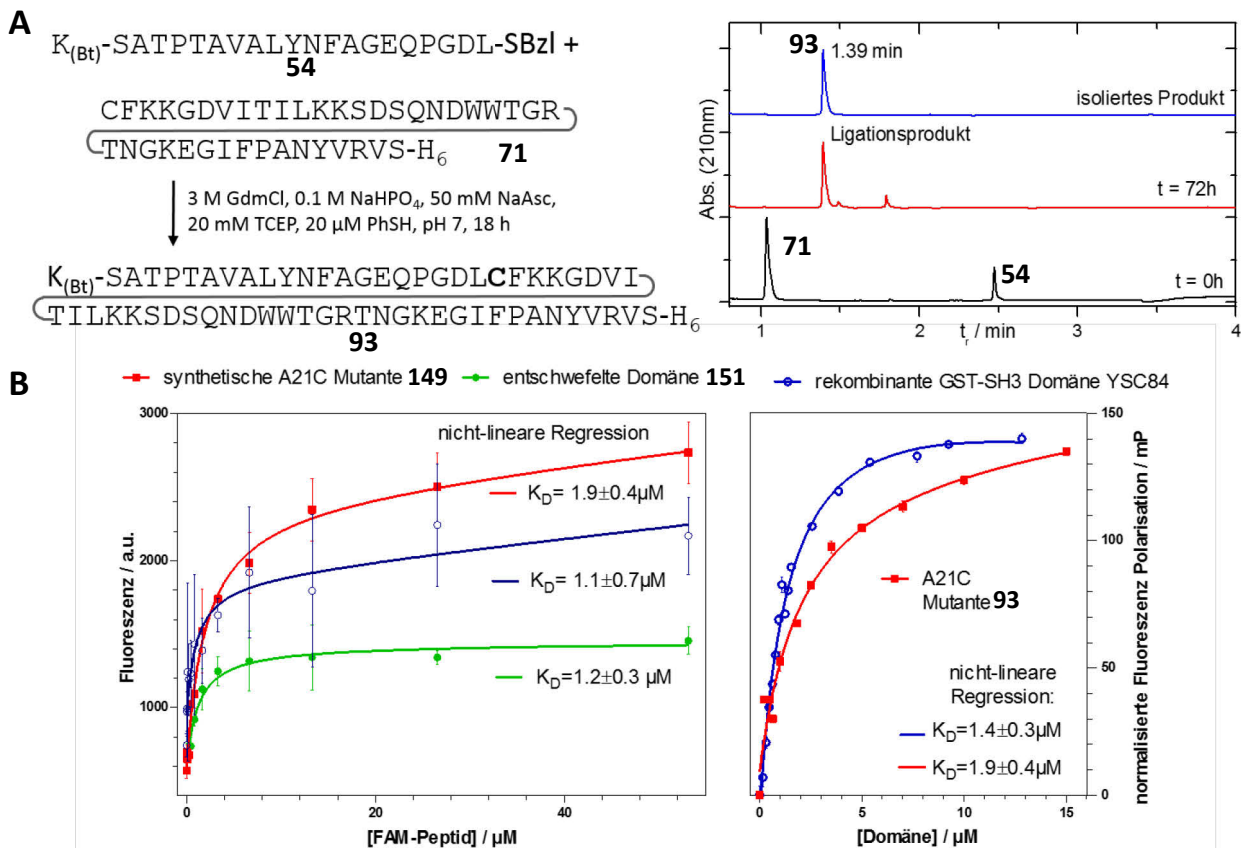


Abbildung 4.16 A: NCL zu dem Produkt **93**, zur Affinitätsbestimmung in Lösung. **B:** Vergleich der synthetischen YSC84 SH3-Domäne vor und nach der Entschwefelung mit der rekombinant gewonnenen Domäne auf der Oberfläche (links) mit Hilfe Oberflächensättigungsanalyse und in Lösung (rechts) mittels Fluoreszenzpolarisation.

Zur Kontrolle der so erhaltenen Daten wurde die SH3-Domäne von YSC84 als Glutathion-S-Transferase (GST) Fusionsprotein rekombinant hergestellt. Anschließend wurde diese auf GSH-funktionalisierten Platten immobilisiert und analog der synthetischen Domänen die Affinität für **155** mittels Oberflächen-Fluoreszenzsättigungsanalyse bestimmt (Abbildung 4.16 B rechts). Außerdem wurde diese in Lösung durch Fluoreszenzpolarisation (FP) charakterisiert (Abbildung 4.16 B rechts). Zusätzlich wurde in Lösung das A21C-Äquivalent **93** der Oberflächen-gebundenen Domäne **149** mittels NCL hergestellt und ebenfalls in Lösung durch FP analysiert (Abbildung 4.16 B rechts). Für die Bindung der nicht entschwefelten A21C-Mutante **149** mit dem FAM-Peptid **155** wurde mit Hilfe des Oberflächen-Fluoreszenzsättigungsanalyse ein $K_D = 1.9 \pm 0.4 \mu M$ bestimmt. Nach der Entschwefelung stieg die Affinität für **155** ($K_D = 1 \pm 0.3 \mu M$). Die GST-markierte SH3-Domäne rekombinanten Ursprungs zeigte auf GSH-funktionalisierten Platten einen $K_D = 1.1 \pm 0.7 \mu M$ und in Lösung einen $K_D = 1.4 \pm 0.3 \mu M$. Die Affinität der A21C-Mutante für **155** in Lösung stimmte mit der auf der Oberfläche überein (beide $K_D = 1.9 \pm 0.4 \mu M$). Die oberflächen-gebundene Mutanten- und Wildtyp-SH3-Domäne wurden zusätzlich mit Peptid **156** in einer Oberflächen-Fluoreszenzsättigungsanalyse gemessen. Die Messungen wurden analog für die V34Pen Mutante

und die entschwefelte Variante der SH3-Domäne von ABP1 mit den Peptiden **155** und **156** durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.2 zusammengefasst.

Tabelle 4.2. Bindungsaffinitäten (bestimmt als K_D in μM)^[a] von immobilisierten Cystein- und Penicillaminmutanten sowie entschwefelten SH3-Domänen von YSC84 oder ABP1 für prolinreiche Peptide ACF2 **155** und YIR003 **156**.

SH3-Domäne	ACF2, 155	YIR003, 156
A21C-Mutante von YSC84 149	1.9 ± 0.4 ($1.9 \pm 0.4^{[c]}$)	10 ± 2
entschwefelt zur nativen YSC84 151	1.2 ± 0.3 ($1.1^{[b]}$, $1.4 \pm 0.3^{[c]}$)	1.6 ± 0.4
V34Pen-Mutante von ABP1 150	2.8 ± 0.6	0.9 ± 0.4
entschwefelt zur nativen ABP1 152	2.6 ± 0.6	0.4 ± 0.2 ($0.1^{[b]}$)

[a] bestimmt durch Fluoreszenzsättigungsanalyse auf der Oberfläche. [b] bestimmt durch *Landgraf et al.*^[181] [c] bestimmt mittels FP in Lösung.

Die erhaltenen Werte stimmten im Fall der nativen YSC84-SH3-Domäne innerhalb der Messunsicherheit mit den Literaturwerten von *Landgraf et al.* sowie den Messungen mit der rekombinant gewonnen GST-markierten SH3-Domäne überein.^[181] Bei der Bestimmung der Bindungsisotherme von ABP1 mit Peptid **156** wurden im Vergleich zu den Literaturwerten leicht erhöhte Werte gemessen. So wurde der K_D -Wert mit Hilfe der Fluoreszenzsättigungsanalyse auf der Oberfläche zu $K_D = 0.4 \pm 0.2 \mu\text{M}$ bestimmt, wobei *Landgraf et al.* einen $K_D = 0.1 \mu\text{M}$ berichteten.^[181] Der Unterschied zwischen A21C-Mutante und Wildtyp war bei der Bindung der SH3-Domäne mit dem ACF2 Peptid **155** nur gering. Allerdings war interessant, dass die Cysteinsubstitution bei der Interaktion mit dem prolinreichen Fragment von YIR003 **156** einen größeren Effekt hatte. Hier wurde die Affinität um 84% verringert (A21C-YSC84-SH3: $K_D = 10 \mu\text{M}$, Wildtyp YSC84-SH3; $K_D = 1.6 \mu\text{M}$). Dies unterstreicht die Bedeutung chemischer Methoden, durch die die Reichweite der NCL über Cysteinligationen hinaus erweitert werden kann. Bei der Untersuchung der ABP1-SH3-Domänen hatte das entschwefelte Protein eine geringfügig niedrigere Affinität für die Peptidbinder **155** und **156** als das Protein vor der Entschwefelung (Tabelle 4.2). Daraus kann gefolgert werden, dass Penicillamin einen vergleichsweise guten Ersatz für Valin darstellt.

4.3.5 Diskussion und Fazit

Die Hydrazonligation ist eine geeignete Methode für die Immobilisierung von Peptiden. Peptidhydrazide lassen sich vergleichsweise einfach herstellen und erweitern die Peptidkette nur um zwei Atome im Vergleich zu Peptidamiden. Die Reaktion ist schnell

und reversibel. Wenn gewünscht kann das Peptidhydrazid durch Hydrazinzugabe zurückgewonnen werden. Durch die Verwendung von NaCNBH_3 konnte die reversible Hydrazonverbindung in eine stabile *N*-Alkylhydrazidbindung überführt werden.

Es wurden nach der in Schema 4.5 gezeigten Methode die Hefe-SH3-Domänen des YSC84- und des ABP1-Proteins sowie deren A21C- und V34Pen-Mutanten mit guten bis sehr guten Ausbeuten auf der Oberfläche hergestellt. Das *N*-Alkylhydrazid war gegenüber den radikalischen Entschwefelungsbedingungen stabil. Die über HRP-SA-Analyse erhaltenen Ausbeuteverteilungen nach der NCL und nach der Entschwefelung waren uniform über alle Kavitäten verteilt. Außerdem wurde die erfolgreiche Entschwefelung zu den nativen Sequenzen fluorometrisch bestätigt. Somit konnten Oberflächenbindungsmessungen durchgeführt werden. Die erhaltenen Affinitäten der SH3-Domänen zu prolinreichen Liganden entsprachen literaturbekannten Werten sowie durchgeführten Messungen in Lösung. Die vorher unbekannten Affinitäten der A21C- und V34Pen-Mutanten für das ACF2-Peptid (**155**) und der YIR003-Sequenz (**156**) wurden bestimmt. Die Interaktion zwischen der A21C-Mutante des YSC84-Proteins mit dem ACF2-Peptid (**155**) wurde ebenfalls in Lösung bestätigt.

Schlussfolgernd kann gesagt werden, dass die Methode für die robuste Synthese von Protein-Domänen auf der Oberfläche tauglich ist. Sie lieferte gleichmäßig auf der Oberfläche verteilte Domänen. Affinitätsbestimmungen in einer Fluoreszenzsättigungsanalyse mit FAM-markierten Peptiden ergeben reproduzierbare Ergebnisse. Bei entsprechender parallelen und automatisierten Umsetzung der Technik, kann die Methode mit geringem Zeitbedarf eine große Zahl an Protein-Domänen liefern, die fest immobilisiert sind. Dennoch liefert sie gegenüber der rekombinanten Herstellung von Protein-Domänen-Arrays keine bedeutenden Vorteile, denn auch diese kann nach einer gewissen Optimierungszeit eine sehr große Zahl an immobilisierten Proteinen bereitstellen. Ein größerer Vorteil der chemischen Methode würde sich bieten, wenn Proteine untersucht werden könnten, die sich mit rekombinanten Methoden nicht oder nur sehr schwer herstellen lassen. Das größte Potential bei dem Vorgehen liegt daher vermutlich in der Möglichkeit posttranslational-modifizierte Proteine auf der Oberfläche herzustellen und zu analysieren.

4.4 Verbesserte selbstreinigende Synthese von langen oder aggregierenden Peptidthioestern

Speziell die Synthese von Peptidthioestern ist mit besonderen Herausforderungen verbunden, da –wie in Abschnitt 2.2.4 beschrieben– mit der Labilität gegenüber Basen umgegangen werden muss. Eine weitere Herausforderung ist die im Vergleich zu Peptidsäuren oder -amiden deutlich erhöhte Hydrophobizität. Dies erschwert die Handhabung nach der Synthese, da sich Peptidthioester häufig schlechter lösen als die Peptidsäuren oder -amide.^[225] Darüber hinaus greifen die meisten Peptidthioestersynthesen auf Polystyrol-Harze zurück. Synthesen nach der Boc-Strategie verwenden fast ausschließlich Polystyrol-Harz, da es kompatibel mit den notwendigen Säuren ist. Von den im Schema 2.6 vorgestellten sechs Peptidthioestersynthesen nach Fmoc-Strategie finden vier fast ausschließlich auf Polystyrol-Harzen statt. Das Chlorotrityl-System ist auf PS-Harzen weniger anfällig für Hydrolyse. Sulfonamide zeigen bessere Ausbeuten auf PS-Harzen als auf polarerer Harzen. Polystyrol-Harze sind aber generell für die Synthese langer oder aggregierender Peptide eher ungeeignet (Abschnitt 2.1, Seite 3).^[28]

4.4.1 Optimierung der Erstbeladung von Sulfonamid-PEG-Harzen

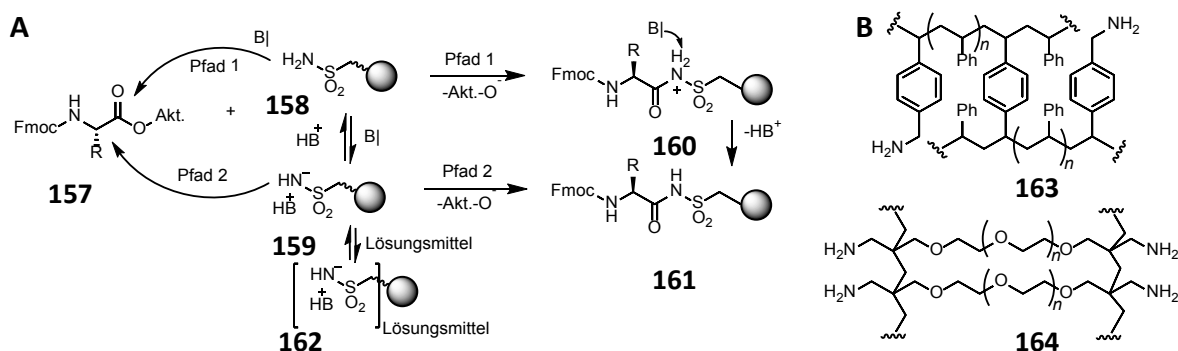
Die von *Mende et al.* entwickelte Synthese von Peptidthioestern mit Selbstreinigungseffekt (Schema 2.9) konnte nicht in jedem Fall die benötigten Mengen und Reinheiten an Peptidthioester liefern. Die herauszuwaschenden Abbruchsequenzen sind Seitenketten-geschützte *N*-acetylierte Thioester. Diese hauptsächlich hydrophoben Verunreinigungen ließen sich nur schwer oder gar nicht aus dem Polystyrolharz extrahieren. Erste Versuche benötigte Thioester für PTM-modifizierte humane SH3-Domänen (Abl und Arg) nach der Peptidthioestersynthese mit Selbstreinigung auf dem funktionalisierten Polystyrol-Harz **47** herzustellen, konnten kein reines Produkt erbringen. Gründe dafür lagen vermutlich in den sehr geringen Rohausbeuten sowie in der starken unspezifischen Absorption der Abbruchsequenzen im polymeren Träger. Mehrere Waschprozesse konnten diese nicht effektiv entfernen.

Für die Synthese der Peptidthioester der humanen SH3-Domänen wurde daher versucht die selbstreinigende Peptidthioestersynthese zu verbessern. Um die Syntheseausbeuten zu erhöhen und die Abbruchsequenzen einfacher herauszulösen erschien es naheliegend PEG-basierte zu erproben. Bei ersten Versuchen, die selbstreinigende Synthese auf einem PEG-Polystyrol-Kopolymer Harz (Tentagel) oder reinem PEG-basierten Harz (Chemmatrix) durchzuführen, fiel auf, dass die Kupplung der ersten Ami-

nosäure auf den Sulfamylbutyryl-Linker sehr schlechte Ausbeuten lieferte. Die Erstbeladungs-Ausbeute ist grundsätzlich ein Problem des *Kenner-Linkers*.^[91b] Aus diesem Grund wurde von der Arbeitsgruppe *Ellman* der Alkylsulfonamid-Linker **173** vorgeschlagen, der durch Kupplung von 3-Carboxypropylsulfonamid auf Amin-funktionalisierte Träger erhalten wird.^[91b] Dieser lieferte im Vergleich zu dem von *Kenner* verwendeten Arylsulfonen wesentlich höhere Ausbeuten bei der Erstbeladung und der nukleophilen Spaltung. Von *Ellman* wurde außerdem die Erstbeladung optimiert. Eine Kupplung mit PyBOP in CHCl₃ bei -20°C wurde als optimale Bedingung gefunden.^[91b] Diese Verbesserung leitete die Verwendung des *safety-catch*-Prinzips für die Thioestersynthese ein. In der zweiten Hälfte desselben Jahres 1999 wurde von *Ingentio et al.*^[89] sowie den Arbeitsgruppen *Bertozzi* und *Ellman*^[226] die Verwendung der Alkylsulfonamide für die Thioestersynthese berichtet.

Obwohl seit diesen Veröffentlichungen viele auch sehr lange Peptidthioester nach dem *safety-catch*-Prinzip synthetisiert wurden, blieben die kommerziell erhältlichen Harze auf Polystyrol beschränkt. Dies folgt vermutlich aus den nicht praktikablen Ausbeuten der Erstbeladung. Eine mögliche Erklärung ist die Abhängigkeit der Erstbeladungsausbeute vom Lösungsmittel. In der Arbeit aus der Gruppe *Ellman* wurden nur geringe Ausbeuten (< 30%) bei Verwendung von DMF erreicht.^[91b] Die Verwendung apolarer aprotischer Lösungsmittel, wie THF, CH₂Cl₂ oder CHCl₃ lieferten hingegen höhere Ausbeuten 50-80%.^[91b] Darüber hinaus waren die angegebenen Ausbeuten uneinheitlich. Dies wird daran deutlich, dass in dem Artikel in einer Tabelle bei zwei gleichen Reaktionsbedingungen eine Ausbeute von 80% sowie von unter 10% angegeben wird.^[91b] Ähnliche Schwankungen wurden ebenfalls bei der Erstbeladung während der Hefe-Thioestersynthese (**54-70**, Abschnitt 4.1.1, Seite 42) beobachtet. Kurzum, die mangelnde Reproduzierbarkeit der Erstbeladung sowie die geringen Beladungsdichten schien die Verwendung polarerer Harze zu erschweren. Im Gegensatz dazu kann erwartet werden, dass die Peptidthioestersynthese mit Selbstreinigungseffekt auf einem polaren Harz (PEG-basiert) höhere Reinheiten der Rohprodukte liefern sollte, als bei Verwendung unpolarer Träger (PS-basiert), denn die Extraktion hydrophober Abbruchsequenzen würde nicht durch die hydrophobe Wechselwirkung mit dem Harz behindert (Schema 4.8 B). Aus diesem Grund wurde es in dieser Dissertation als sinnvoll angesehen, die Verwendung polarer Träger detaillierter zu untersuchen.

Bei der Reaktion einer aktivierten Aminosäure **157** mit Sulfonamid-funktionalisierten Harzen sind zwei Reaktionspfade möglich (Schema 4.8 A).

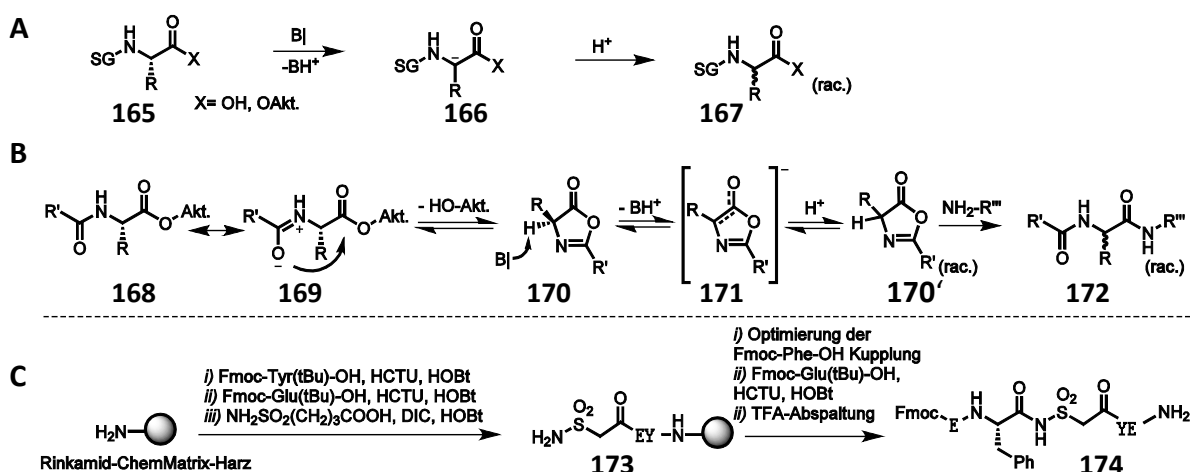


Schema 4.8 A: Mögliche Reaktionspfade der Bildung des *N*-Acyl-Sulfonamids **161**, sowie mögliche Komplexierung des Ionenpaares **159** durch das Lösungsmittel. **B:** Struktur des Aminomethyl Polystyrol- **163** und des Aminomethyl ChemMatrix-Harzes **164**. Akt. = Aktivator.

Im Reaktionspfad 1 kann das Sulfonamid **158** direkt mit dem Aminosäure-Derivat **157** reagieren, wobei das protonierte Intermediat **160** entsteht. Deprotonierung durch die in der Reaktionsmischung vorhandene Base liefert das gewünschte Produkt **161**. Das Sulfonamid **158** auf dem polymeren Träger steht bei Gegenwart einer Base allerdings auch mit dem Sulfonamid Anion **159** im Gleichgewicht. Dieses Anion kann ebenfalls mit Aminosäure **157** reagieren und liefert direkt das Produkt **161** (Reaktionspfad 2). Die analoge Reaktion eines Amin-terminierten polymeren Trägers würde vermutlich hauptsächlich über den Reaktionspfad 1 verlaufen, da der pKs-Wert eines primärenamins (~ 30 in DMSO)^[227] für die Deprotonierung mit Hilfe der im Allgemeinen verwendeten tertiären Amins zu hoch ist. Der pKs-Wert des Sulfonamids **158** ist vermutlich um 13 Größenordnungen niedriger (MeSO_2NH_2 : $\text{pKs} = 17.5$ in DMSO)^[228]. Außerdem ist die neutrale Sulfonamidform für einen Angriff nach Reaktionspfad 1 möglicherweise nicht nukleophil genug. Von der Arbeitsgruppe Mayr wurde ein Nukleophilie-Parameter ($N_{\text{Par.}}$) eingeführt, der bei dem Vergleich von Nukleophilen nützlich ist.^[229] Die Werte werden an Hand der Geschwindigkeitskonstante ($k_{20^\circ\text{C}}$) einer Reaktion mit einem Elektrophil bekannter Elektrophilie ($E_{\text{Par.}}$) experimentell bestimmt. Der Parameter $N_{\text{Par.}}$ ist ein Nukleophil-spezifischer, Lösungsmittel-abhängiger Wert. Hohe Werte repräsentieren eine hohe Nukleophilie. Laut dieser Skala besitzen das Methansulfonamid Anion ($N_{\text{Par.}} = 18.61$)^[230] und das *p*-Toluensulfonamid Anion ($N_{\text{Par.}} = 17.14$)^[230] eine vergleichbare Nukleophilie wie das sekundäre Amin Piperidin ($N_{\text{Par.}} = 17.19$)^[231] in DMSO. Primäre Amine besitzen in DMSO eine Nukleophilie von ca. 14 (Ethyl-Glycinat $N_{\text{Par.}} = 14.30$)^[231]. Betrachtet man den pKs-Wert und die Nukleophilie ist es sehr wahrscheinlich, dass ausschließlich die Sulfonamid-Anion-Spezies **159** mit aktivierten Aminosäuren reagiert und somit Reaktionspfad 2 der wahrscheinlichste ist. Es ist demnach nachvollziehbar, dass das Lösungsmittel einen großen Einfluss auf die Ausbeute ausübt. Die Theorie des „nackten Anions“ kennt viele Beispiele bei denen die Nukleophilie eines

Anions stark von dem Lösungsmittel abhängt. Je loser die Solvathülle um das Anion oder das Kontaktionenpaar gruppiert ist umso reaktiver ist das Anion.^[232] Das Sulfonamid-Anion **159** steht im Gleichgewicht mit einem Komplex **162**, in dem das Kontaktionenpaar durch Lösungsmittelmoleküle so dicht komplexiert wird, dass die Annäherung der aktivierten Aminosäure erschwert wird. Polare Lösungsmittel komplexieren das Kontaktionenpaar effizienter und hemmen den Reaktionspfad 2. Der Einfluss der Lösungsmittel-Polarität auf die Erstbeladungsausbeute könnte somit erklärt werden.

Aus der dargelegten Hypothese würde folgen, dass durch Erhöhung der Basenmenge die Konzentration an Anion **159** steigt und somit die Ausbeuten gesteigert werden können. Eine Erhöhung der Basenmenge ist in der Regel mit einer erhöhten Racemisierung der aktivierten Aminosäure verbunden. Dabei werden in der Literatur hauptsächlich zwei Mechanismen angegeben. Eine Möglichkeit ist die Deprotonierung der α -CH-Einheit der Aminosäure **165** vor oder nach der Aktivierung (Schema 4.9 A). Die CH-Azidität am chiralen Kohlenstoffatom kann durch Aktivatoren, die *N*- α -Schutzgruppe sowie die Seitenkette soweit erhöht werden, dass es zu Deprotonierung und Bildung des Anions **166** kommen kann. Eine Protonierung der negativen Ladung führt zu der racemischen Aminosäuremischung **167**. Eine weitere Möglichkeit, die Stereoinformation von aktivierten Aminosäuren **168** zu verlieren, ist die Deprotonierung von Oxazolonen **170**. Diese werden durch den intramolekularen Angriff des Carbonyl-Sauerstoffatoms einer Carbamatschutzgruppe auf die aktivierte Carbonsäure **169** generiert (Schema 4.9 B).



Schema 4.9 A: Racemisierung durch Deprotonierung des α -Protons einer zu kuppelnden Aminosäure **165**. **B:** Racemisierung aktivierter Carbamat-geschützter Aminosäuren **168** über den Oxazolone-Mechanismus. **C:** Synthese des *N*-Acyl-Sulfonamidpeptids **174** durch Optimierung der Kupplung auf das Sulfonamid **173**. SG = Schutzgruppe.

Das so gebildete Oxazolone **170** besitzt eine erhöhte α -CH-Azidität. Durch eine Deprotonierung wird ein stabilisiertes Carbanion **171** generiert. Die Reprotonierung erzeugt das

Oxazolone **170'** als racemische Mischung. Der Angriff eines Amins an **170'** oder **168'** liefert das racemische Amid **172**.

Um den Einfluss der Basen und ihre Menge auf die Ausbeuten und den Racemisierungsgrad zu überprüfen, wurde eine Reaktionsfolge nach Schema 4.9 C durchgeführt. Das auf einem Rinkamid-ChemMatrix-Harz aufgebaute *N*-Sulfonamid-Dipeptid **173** wurde unter verschiedenen Reaktionsbedingungen mit Fmoc-Phe-OH versetzt. Anschließende Kupplung von Fmoc-Glu-OH und finale Spaltung mit TFA vom Trägermaterial lieferte das Peptid **174**. Dieses wurde hinsichtlich Ausbeute und Racemisierung mittels UPLC-MS und UV-Spektroskopie analysiert. Es wurde Fmoc-Phe-OH gewählt, da dieser Baustein relativ anfällig für Racemisierung ist und bei der Kupplung aufs Sulfonamid-Harz häufig geringe Ausbeuten liefert.^[91b] Die Ausbeuten der Kupplung wurden darüber hinaus UV-spektroskopisch über die Absorption des Fulven-Piperidin-Addukts nach der Fmoc-Abspaltung bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.3 zusammengefasst.

Tabelle 4.3: Optimierungsversuche bei der Kupplung von 4 Äq. Fmoc-Phe-OH, 1 h, Rt auf Peptid **173**.

Eintrag	n/ μ mol ^[a]	Base	vol.%	Lösungsmittel	Aktivator ^[b]	Additiv ^[b]	Ausbeute ^[d]	-(D)Phe ^[e]
1	0.4	DIEA	50%	DMF	HBTU		28%	0%
2	0.6	DIEA	10%	DMF	HBTU		35%	0%
3	2.4	NMM	10%	DMF	HBTU		6%	2%
4	2.1	NMM	50%	DMF	HBTU		5%	2%
5	0.4	DIEA	50%	CHCl ₃	HBTU		6%	0%
6	0.7	DIEA	50%	CHCl ₃	PyBOP		44%	4%
7	2.2	DIEA	50%	CHCl ₃	PyBOP	Oxyma	13%	0%
8	2.2	DIEA	50%	CHCl ₃	PyBOP	HOBt	16%	2%
9	2.1	DIEA	50%	CHCl ₃	HCTU	Oxyma	7%	1%
10	2.2	DIEA	10%	CHCl ₃	HCTU	Oxyma	23%	2%
11	2.2	DIEA	10%	CHCl ₃	PyBOB	Oxyma	8%	2%
12	2.1	DIEA	10%	CHCl ₃	PyBOP		62%	5%
13	1.9	DIEA	50%	CHCl ₃	PyBOP		38%	8%
14	2.1	DIEA	40%	CHCl ₃	PyBOP		29%	5%
15	2.1	DIEA	50%	CHCl ₃	PyBOP ^[c]		48%	4%
16	1.8	DIEA	4%	DMF	HCTU	Oxyma	5%	1%
17	1.7	DIEA	10%	CHCl ₃	PyBOB		58%	3%

[a] Ansatzgröße [b] 4 Äquivalente (0.1 M) bezogen auf das Sulfonamid-Harz **173**. [c] 8 Äquivalente und Fmoc-Phe-OH. [d] Ausbeute UV-spektroskopisch bestimmt mit Hilfe der Absorption des Fulven-Piperidin-Addukts nach der Fmoc-Abspaltung. [e] Prozentsatz an (D)Phenylalanin im Peptid **174**, ermittelt über das Integral der UV-Absorption des (D)-Diastereomers **174'** in der UPLC-MS.

Der erste positive Effekt der erhöhten Basenmenge war, dass sich der schwerlösliche Aminosäurebaustein Fmoc-Phe-OH ab Basenmengen von 10 vol.% gut in Chloroform

löste. Nach *Mende* wurde bei schwerlösliche Aminosäurebausteinen etwas DMF als Kosolvenz zu der Reaktionsmischung gegeben (z.B. bei Phe und Gly nötig).^[207] Die erhöhte Polarität führte zu Ausbeuteverlusten. Es lässt sich aus den dargestellten Ergebnissen entnehmen, dass sich Diisopropylethylamin (DIEA) besser als Base eignet als *N*-Methylmorpholin (NMM) (vgl. Eintrag 1, 2 mit 3, 4). Der höhere pKs-Wert von DIEA (10.1 ggü. 7.4) könnte dies erklären.^[233] Additive scheinen keinen positiven Einfluss auf die Ausbeute auszuüben. Allerdings wirkt sich die Verwendung reduzierend auf die Racemisierung aus (Eintrag 7-11 und 16). Eine hohe Basenmenge von 50 vol.% sollte vermieden werden, bei sinkender Ausbeute steigt die Racemisierung. Dennoch waren die erhaltenen Ausbeuten mit 10% DIEA höher als die vormalig nach *Ellman* und *Mende* (5 Äq. 2.5 vol.%) auf PEG-Harzen erhaltenen Ausbeuten (< 10%).^[91b,207] Die Verwendung von PyBOP und CHCl₃ lieferte höhere Ausbeuten als andere Aktivatoren oder andere Lösungsmittel. Es wurde daher eine weitere Optimierungsreihe durchgeführt, in der CHCl₃ als Lösungsmittel, DIEA als Base und PyBOP als Aktivator verwendet wurden. Es wurde außerdem die Reaktionszeit, -temperatur sowie Wiederholungen analysiert (Tabelle 4.4).

Tabelle 4.4: Zweite Optimierungsreihe zur Kupplung von Fmoc-Phe-OH auf das Peptid **173**.^[a]

Eintrag	μmol:	vol.% DIEA	Zeit	Temp.	Besonderheiten	Ausbeute	-(D)Phe- ^[d]
1	1.6	10%	2 x 2h	-25°C	8 Äq. PyBOP ^[b]	58%	1.50%
2	1.6	10%	2 x 2h	-25°C		70%	1.20%
3	1.7	50%	2 x 2h	Rt.	c = 0.05 M	46%	1.60%
4	1.8	20%	1h	Rt.		53%	2.80%
5	2.1	30%	1h	Rt.		66%	3.80%
6	1.8	40%	1h	Rt.		58%	4.30%
7	2.0	50%	1h	Rt.		35%	1.70%
8	1.8	10%	2 x 2h	-25°C	Vorkühlung -25°C	79%	0.90%
9	1.2	20%	2 x 2h	-25°C	Vorkühlung -25°C	95%	0.97%
10	1.4	30%	2 x 2h	-25°C	Vorkühlung -25°C	98%	0.90%
11	1.2	40%	2 x 2h	-25°C	Vorkühlung -25°C	96%	0.78%
12	1.5	50%	2 x 2h	-25°C	Vorkühlung -25°C	80%	0.93%

[a] 4 Äquivalente Fmoc-Phe-OH, PyBOP bezogen auf das Sulfonamid-Harz **173** (0.1 M) in CHCl₃. [b] 8 Äquivalente PyBOP und Fmoc-Phe-OH. [c] Ausbeute UV-spektroskopisch bestimmt mit Hilfe der Absorption des Fulven-Piperidin Addukts nach der Fmoc-Abspaltung. [d] Prozentsatz an (D)Phenylalanin im Peptid **174**, ermittelt über das Integral der UV-Absorption des (D)-Diastereomers **174'** in der UPLC-MS.

Die aufgeführten Ergebnisse zeigen, dass bei Raumtemperatur höhere Racemisierungswerte entstehen. Die Verdopplung der Äquivalente (Äq.) schien keinen Einfluss auf die Ausbeute zu haben (Eintrag 1 ggü. 2). Außerdem stellt sich eine Basenmenge von 30 vol.% (70 Äq., 1.75 M) als optimal dar (Eintrag 5 und 10). Die geringen Ausbeuten ab 50 vol.% Base können durch die steigende Polarität des Lösungsmittels erklärt werden.

Es wurde außerdem der Einfluss der Temperatur der Lösungen sowie des Harzes getestet. Die separat in Chlorform gelösten Reagenzien Fmoc-Phe-OH mit Base, sowie PyBOP und der Spritzenreaktor mit dem Harz **173** wurden 15 min bei -25°C gekühlt. Die Vorkühlung der Reagenzien ist entscheidend, um den Anteil an D-Phe unter einem Prozent zu halten. Die niedrigere Temperatur (-25°C) wird nach Mischung der Lösung für die Reaktion beibehalten. Generell reduzierte die niedrige Temperatur nicht die Kupplungsausbeute, verhinderte aber effizient die Epimerisierung. Die ermittelten optimalen Kupplungsbedingungen sind: 4. Äq. PyBOP und Fmoc-Phe-OH in 0.1 M Konzentration in CHCl₃ mit 30 vol.% DIEA, bei -25°C mit Vorkühlung.

Mit diesen optimierten Bedingungen wurden alle 20 proteinogenen Aminosäuren analog Schema 4.9 C auf das Sulfonamid-funktionalisierte Harz **173** gekuppelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.5 aufgeführt. Die Ausbeuten bewegten sich zwischen 32 und 93%, wobei der Mittelwert 68% beträgt. Cystein zeigte Epimerisierung von 21.7%. Cystein ist dafür bekannt, dass es auch unter normalen Kupplungsbedingungen mit Ionium-Reagenzien und 8 Äq. Base nach dem α -CH Deprotonierungs-Mechanismus Schema 4.9 A racemisiert. Der Fmoc-Cys(Trt)-OH Baustein zeigt dabei Racemisierungsraten von 8%.^[234] Ein Verzicht auf Base durch die Verwendung von Carbodiimiden als Aktivator reduziert dies auf nahezu null. Eine Optimierung für Cystein wurde aber nicht durchgeführt, da Cysteinthioester eine geringe synthetische Relevanz haben.

Tabelle 4.5: Kupplungsausbeuten und Racemisierungswerte bei der Kupplung aller proteinogenen Aminosäuren auf das Harz **173** nach optimierten Bedingungen.^[a]

Aminosäure	Ausbeute ^[c]	Racemisierung ^[d]	Aminosäure	Ausbeute ^[c]	Racemisierung ^[d]
Ala	86%	< 0.1%	Met	80%	n.b.
Cys	78%	21.7%	Asn	68%	< 0.1%
Asp	68%	n.b.	Pro	49%	< 0.1%
Glu	74%	< 0.1%	Gln	62%	0.0%
Phe	88%	0.9%	Arg	70%	n.b.
Gly	93%	< 0.1%	Ser	76%	< 0.1%
His	72%	4.5%	Thr	62%	< 0.1%
Ile	32%	< 0.1%	Val	53%	< 0.1%
Lys	76%	2.3%	Trp	36%	< 0.1%
Leu	76%	1.5%	Tyr	63%	1.2%

[a] 4 Äquivalente Fmoc-AS-OH, PyBOP bezogen auf das Sulfonamid-Harz **173** (0.1M) in CHCl₃ bei -25°C mit Vorkühlung. [c] Ausbeute UV-spektroskopisch bestimmt mit Hilfe der Absorption des Fulven-Piperidin Addukts nach der Fmoc-Abspaltung. [d] Prozentsatz an (D)Aminosäure im gebildeten N-Acyl-Sulfonamid Peptid, ermittelt über das Integral der UV-Absorption des (D)-Diastereomers in der UPLC-MS. n.b. = nicht bestimmbar.

In dem Experiment mit Histidin wurde 4.5% (D)His erhalten. Dort induziert das *N*I (auch π -*N*) des Imidazolrings eine Enolisierung des Aktivesters unter basischen Bedin-

gungen und führt zur Bildung von (D)His in Höhe von 8%, unter Mikrowellen-Bedingungen sogar von 17%.^[234] Ungewöhnlich ist der Wert für (D)Lys von 2.3 %. Außerdem zeigen Tyr und Leu Werte über 1%. Alle anderen Aminosäuren zeigen Epimerisierungswerte von unter einem Prozent. Bei den < 0.1% Experimenten wurde ein Massensignal der entsprechenden Diastereomerenmasse bei einer anderen Retentionszeit als dem Hauptpeak gefunden. Das EIC-Signal war allerdings zu gering für eine Integration. Bei drei Experimenten (n.b.) konnten kein Massensignal außerhalb des Hauptpeaks (L)AS identifiziert werden. Dies kann damit erklärt werden, dass keine Racemisierung geschah oder dass die (D)AS und (L)AS Diastereomere koeluierten, wobei keine Prozentzahl ermittelt werden kann.

4.4.2 Verbesserte Synthese der Abl- und Arg-Peptidthioester

Eine effiziente Herstellung von SH3-Domänen mit Hilfe der chemischen Totalsynthese ist eine schwierige Aufgabe.^[207] SH3-Domänen besitzen fünf β -Faltblätter. Es ist bekannt, dass β -Faltblatt-reiche Sequenzen geringe Syntheseausbeuten aufweisen, was durch eine Aggregation der wachsenden Peptidkette erklärt wird.^[28] Die *N*-terminalen Thioesterfragmente für die Abl- und Arg-SH3-Domänen Synthese waren besonders herausfordernd, da unter den literaturbeschriebenen Bedingungen der Selbstreinigung keine praktikablen Produktmengen erhalten werden konnten.

In einem ersten Ansatz wurde versucht, die Hauptabbruchsequenzen durch die Verwendung von Pseudoprolin-Dipeptiden zu reduzieren. Die Verwendung des Fmoc-Leu-Ser(Ψ (Me,Me)Pro) Bausteins konnte die Ausbeute (ermittelt über die Absorption des Fulven-Piperidin Addukts) bei der der Synthese des pY³⁰ Abl-Thioesters **179** von 13.8% auf 35.4% erhöhen. Die Ausbeuten der Synthese des Arg-Thioesters **193** wurde von 11% auf 28% verbessert (Abbildung 4.17 A). Dennoch blieben die Synthesen schwierig, weil die Abbruchsequenzen nicht extrahiert werden konnten. Nach der finalen TFA-Abspaltung wurden die ungewünschten Abbruchsequenzen allerdings aus dem Harz gelöst und führten zu einer geringen Reinheit des Produkts.

Um die Syntheseausbeuten während der Kettenverlängerung und beim Waschen zu erhöhen wurde das in Schema 4.8 B dargestellte ChemMatrix Harz **164** verwendet. Dieses PEG-Polymer war Aminomethyl-funktionalisiert. Es wurde mit den Bausteinen Glu(Ph/Pr) und 3-Carboxypropansulfonamid verlängert, entsprechend der Struktur **47** in Schema 2.9 auf Seite 25. Anschließend wurde die Erstbeladung mit den in Abschnitt 4.4.1 beschriebenen optimierten Kupplungsbedingungen durchgeführt.

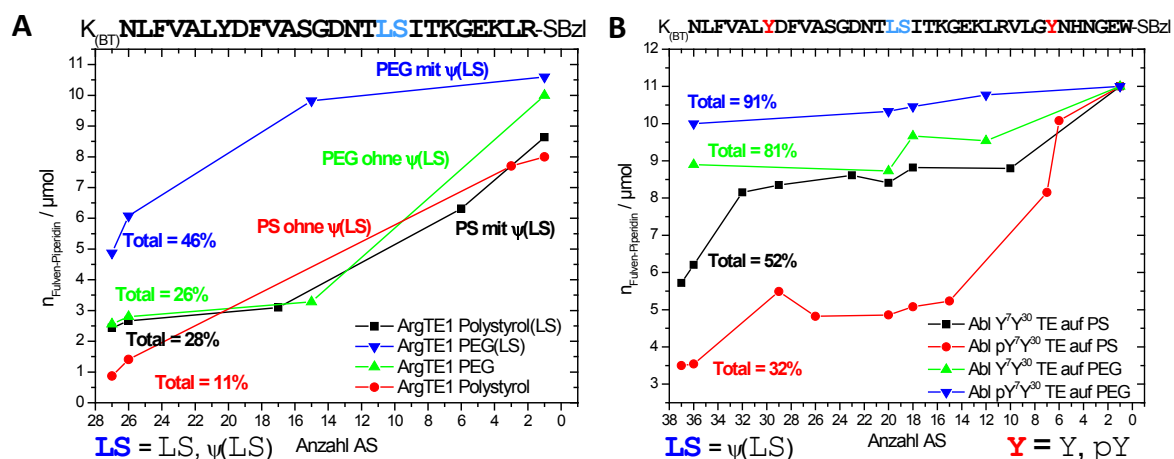


Abbildung 4.17 Vergleich der Ausbeute-Entwicklung während der SPPS, ermittelt über die Absorption des Fulven-Piperidin Addukts. **A:** Vergleich der Ausbeuten während der Synthese des Y⁷ Arg-Thioesters **193** auf PS und auf PEG-Harz sowie mit und ohne Verwendung des Leu-Ser-Pseudoprolin-Dipeptids Ψ (LS). **B:** Vergleich der Ausbeuten bei der Synthese des Y⁷Y³⁰ Abl-Thioesters **177** und des pY⁷ Thioesters **178** auf PS und PEG-Harz.

Es ist bekannt, dass die Verwendung von Pseudoprolin-Dipeptiden und PEG-Harzen einen positiven Effekt auf die Syntheseausbeuten haben (Synergie).^[235] Um dies zu überprüfen, wurde der Arg-SH3-Thioester **193** parallel auf Polystyrol- und auf ChemMatrix-Harz derselben allgemeinen Struktur **47** einmal mit und einmal ohne den Baustein Fmoc-Leu-Ser(Ψ (Me,Me)Pro)-OH synthetisiert. Die Verwendung des Pseudoprolins steigerte auf dem PS-Harz die Ausbeute um 155% (Abbildung 4.17 A). Bei Benutzung des PEG-Harzes ohne Pseudoprolin entwickelten sich die Kupplungsausbeuten sehr ähnlich der Synthese auf PS-Harz mit Pseudoprolin. Bemerkenswerterweise steigerte die Verwendung von PEG-Harz und Pseudoprolin steigerte die Ausbeute um den Faktor 3.2, bei der Synthese des Arg-Thioesters **193**. Es konnte vor allem der Reduzierung der Kupplungs-Ausbeuten nach Aminosäure 15 entgegengewirkt werden. Ein anderer Vergleich wurde für die Synthese des Y⁷Y³⁰-Abl-Thioesters **177** und des pY⁷-Thioesters **178** auf PS und PEG-Harz durchgeführt (Abbildung 4.17 B). Bei dieser Synthese wurden beide Thioester mit dem Leu-Ser Pseudoprolin auf PS und auf PEG-Harz synthetisiert. Die Synthesen auf dem PEG-Harz lieferten sehr gute Ausbeuten von 52% (Verbesserung ggü. PS um den Faktor 1.56) für den Y⁷Y³⁰-Abl-Thioester **177** und 91% (Faktor 2.84) für den pY⁷-Thioester **178** (pY⁷ Phosphorylierung an Position 7 nach der Abl-SH3-Domänen Numerierung). Die Synthesen auf dem PS-Träger führten besonders nach Aminosäure 29 zu einem deutlichen Abfall der Kupplungseffizienz. Anschließend wurde die selbstreinigende Peptidthioestersynthese entsprechend Schema 2.9 bis zu dem Schritt der Struktur **52** durchgeführt. Es musste darauf geachtet werden, dass das Harz vor der Aktivierung (**49**→**50**) mit trockenem THF gewaschen und am Hochvakuum getrocknet wird, um Reste von Wasser zu entfernen. Das polare Harz bindet mehr

Wasser als das Polystyrolharz mit dem die selbstreinigende Peptidthioestersynthese entwickelt worden ist. Nach der Thiolyse werden die Harz-gebundenen Thioester **52** erhalten. Darüber hinaus wird die Bindung der Abbruchsequenzen mit dem Harz gespalten. Durch Waschen des Harzes werden die Abbruchsequenzen entfernt. Beispiele für Chromatogramme die vor dem Waschen und nach dem Waschen gemessen worden sind, sind in Abbildung 4.18 gezeigt.

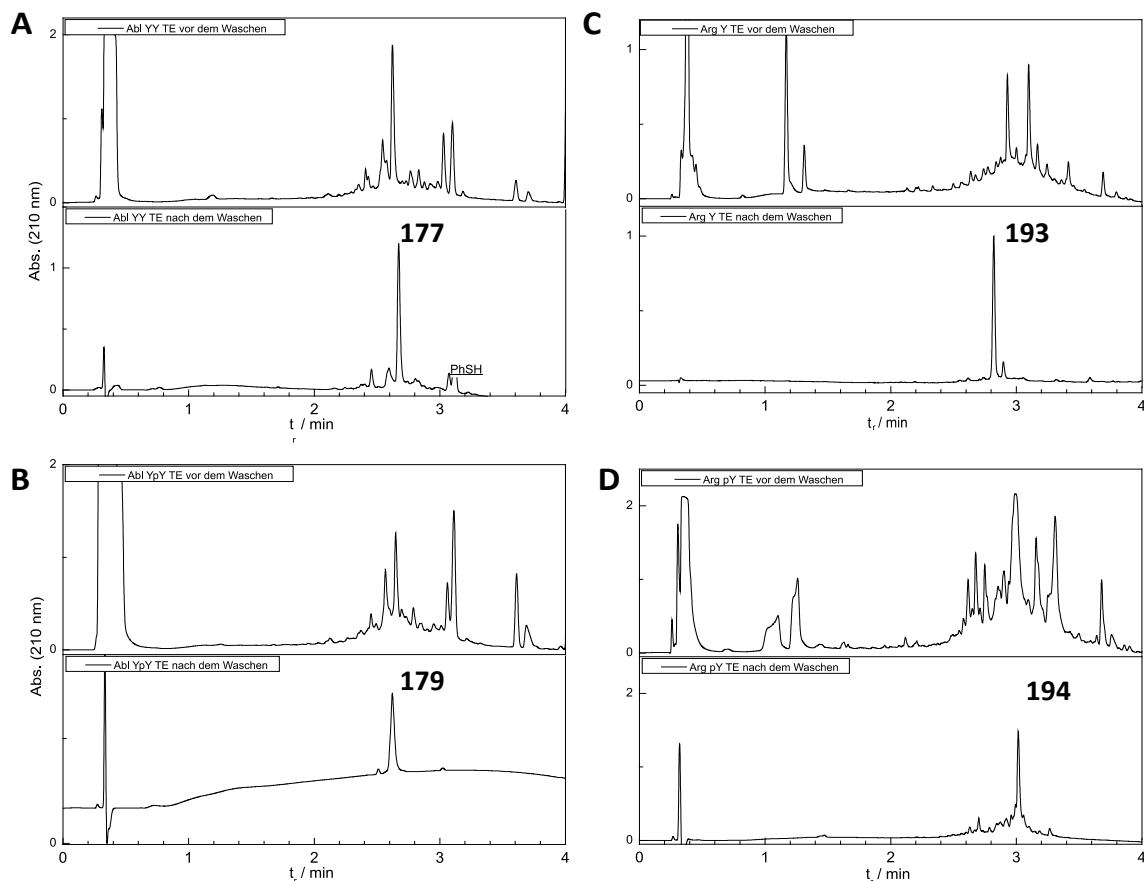


Abbildung 4.18: Vergleich der mit Hilfe der selbstreinigende Peptidthioestersynthese auf PEG-Harz hergestellten Peptide vor und nach dem Waschen. **A:** Y⁷Y³⁰ Abl-Thioester **177**. **B:** pY³⁰ Abl-Thioester **179**. **C:** Y⁷ Arg-Thioester **193**. **D:** pY⁷ Arg-Thioesters **194**

Tabelle 4.6: Übersicht über die synthetisierten Peptidthioester der Abl- und Arg-SH3-Domänen. Sequenzen sind in Schema 4.10 und Schema 4.11 aufgeführt.

Phosphoform	Nr.	#AS	Reinheit vor dem Waschen	Reinheit nach dem Waschen	Ausbeute ^[c]		
Abl Y ⁷ Y ³⁰	177	37	28% ^[a]	30% ^[b]	79% ^[a]	92% ^[b]	5%
Abl pY ⁷ Y ³⁰	178	37	23% ^[a]	48% ^[b]	78% ^[a]	80% ^[b]	7%
Abl Y ⁷ pY ³⁰	179	37	21% ^[a]	33% ^[b]	89% ^[a]	91% ^[b]	6%
Abl pY ⁷ pY ³⁰	180	37	26% ^[a]	34% ^[b]	88% ^[a]	90% ^[b]	5%
Arg Y ⁷	193	27	17% ^[a]	23% ^[b]	89% ^[a]	97% ^[b]	20%
Arg pY ⁷	194	27	6% ^[a]	7% ^[b]	69% ^[a]	89% ^[b]	38%

[b] Reinheiten wurden durch die UPLC-MS bei 210 nm bestimmt. [b] Reinheiten wurde bei 278 nm bestimmt. [c] Ausbeuten wurden durch Absorption bei 278 nm bestimmt. #AS = Anzahl an Aminosäureresten.

Das Waschprotokoll bestand aus dem zweimaligen Waschen mit fünfmal 2 ml DMSO (1% TFA), fünfmal 2 ml einer Lösung von 80% DMSO und 20% NMP (1% TFA),

fünfmal 2 ml THF (1% TFA) und fünfmal 2 ml einer Lösung von 75% DCM und 25% TFE (1% TFA). Danach wurde final vom Harz abgespalten. In der Regel wurden gute bis sehr gute Reinheiten erhalten. Es konnten durch Verwendung des PEG-Harzes alle *N*-acetylierten Abbruchsequenzen herausgelöst werden. Die verbleibenden Verunreinigungen rührten von unvollständiger Acetylierung während der SPPS her. Die Ausbeuten und Reinheiten der so synthetisierten Peptidthioester sind in Tabelle 4.6 zusammengefasst.

4.4.3 Diskussion und Fazit

Als nachteilig galten bei der Verwendung des *Kenner*-Linkers bisher die häufig geringen und nicht-vorhersagbaren Erstbeladungsausbeuten als auch die Notwendigkeit Polystyrol-Harze zu verwenden. Der Reaktionsmechanismus der Acetylierung des Sulfonamids während der Kupplung der ersten Aminosäure wurde in diesem Unterkapitel diskutiert. Durch eine Erhöhung der Basenmenge konnte die geringen Ausbeuten bei Verwendung von polaren Harzen deutlich erhöht werden. Es wurden die Erstbeladungsausbeuten für alle 20 proteinogenen Aminosäuren bestimmt. Sie waren moderat bis sehr gut für die Mehrzahl der Aminosäuren. Darüber hinaus waren die Ausbeuten geringeren Schwankungen unterlegen als bei Verwendung der bisher veröffentlichten Protokolle.

Bei der Synthese der schwierigen Arg und Abl-Thioestersequenzen war die Verwendung des PEG-basierten Harzes von großen Vorteil. Besonders in Kombination mit Pseudoprolin-Dipeptiden konnten die Ausbeuten für Abl- und Arg-Thioester um bis zu 300% erhöht werden. Auch das Entfernen von Abbruchsequenzen aus dem PEG-Harz durch Waschen wurde verbessert. Lediglich nicht blockierte Abbruchsequenzen blieben zurück, so dass eine Optimierung des Blockierungsschrittes nötig ist.

Somit konnten die für die Oberflächensynthese benötigten Arg- und Abl-Thioester ohne HPLC-Reinigung in Ausbeuten und Reinheiten erhalten werden, die eine direkte Anwendung in der NCL aussichtsreich erschienen ließen.

4.5 Oberflächensynthese und -analyse humaner phosphorylierter SH3-Domänen

Nachdem die Machbarkeit der Oberflächensynthese und -analyse gezeigt wurde (Unterkapitel 4.3), stand die Synthese und Analyse von humanen SH3-Domänen im Fokus. Es wurden zwei SH3-Domänen der Abelson-Tyrosinkinasen-Familie auf der Oberfläche synthetisiert und evaluiert. Zum einen wurde die SH3-Domäne der Tyrosinkinase Abl welche ursächlich mit der chronischen myeloischen Leukämie (CML) verknüpft ist, hergestellt (Abschnitt 2.6, Seite 34).^[190,236] Zum anderen sollte die SH3-Domäne der engverwandten Abl2-(auch Arg)-Tyrosinkinase, einer eng verwandten Kinase, die eine wichtige Rolle in der Organisation des Cytoskeletts und bei Fehlfunktion in der Tumorprogression spielen soll, synthetisiert werden.^[236d,237]

Tatárová et al. beschreiben die regulatorische Funktion der Phosphorylierung innerhalb der Klasse der SH3-Domänen als omnipräsent.^[197] Die Aussagen stützen sich dabei auf Daten aus der *phosphosite*-Datenbank in der Proteinphosphorylierung archiviert wird.^[112] Tyrosin ist in SH3-Domänen häufiger phosphoryliert als in anderen Proteinen (zu 67% in SH3-Domänen ggü. zu 21% im gesamten humanen Phospho-Proteom).^[197] Es wurde postuliert, dass die Tyrosinphosphorylierung innerhalb von SH3-Domänen, neben einer Rekrutierung von anderen Proteinen über *Src-homology 2* (SH2)- oder PTB-Domänen, den Effekt hat, die Affinität für prolinreiche Liganden zu mindern. In dem Übersichtsartikel wurde 17 Literaturstellen (zwei Literaturstellen für Abl) für 13 SH3-Domänen angegeben, in denen diese negative Regulierung der SH3-Funktion beschrieben wird.^[197] In der *phosphosite* Datenbank sind viele Einträge für die Phosphorylierung der Abl- und Arg-SH3-Domänen zu finden. Alle drei Tyrosinreste der Abl (pY⁷ 14 Einträge, pY³⁰ 196 Einträge, pY⁵² 223 Einträge) und der Arg-SH3-Domäne (pY⁷ 10 Einträge, pY³⁰ 1 Eintrag, pY⁵² 220 Einträge) wurden phosphoryliert nachgewiesen (Stand 09.09.2016). Die Positionen Y⁷, Y³⁰ und Y⁵² in der SH3-Domäne entsprechen den Positionen der Numerierung Y⁷⁰, Y⁹³ und Y¹¹⁵ im Abl-Protein sowie Y¹¹⁶, Y¹³⁹ und Y¹¹⁶ im Arg-Protein. Diese Phosphorylierungen wurden vor allem in Krebszellen, besonders häufig in Leukämiezellen, beobachtet. Der Einfluss der Phosphorylierung auf das Bindungsverhalten wurde bis jetzt nur mit biologischen Methoden für die Abl-SH3 pY⁷ Position untersucht, da dies die einzige Position ist, die sich ortspezifisch mit kommerziell erhältlichen Kinasen phosphorylieren lässt.^[198,200] Eine Untersuchung der anderen Phosphoformen scheint in Anbetracht der Häufigkeit der Datenbank-Einträge ebenfalls wünschenswert. Die in Unterkapitel 4.3 beschriebene chemische Methodik sollte genutzt werden, um alle sieben Phosphoformen sowie die unphosphorylierte Form der

SH3-Domänen von Abl- und Arg im Parallellformat zu synthetisieren und zu analysieren.

4.5.1 Oberflächensynthese der (Phospho)SH3-Domänen von Abl- und Arg

Die zu synthetisierenden Peptide für die Synthese der Abl-SH3-Domäne sowie die resultierenden Ligationsprodukte sind in Schema 4.10 aufgeführt. Es wurden zwei *N*-Cysteinylpeptidhydrazide (**175**, **176**) mit einfacher Tyr oder pTyr-Position sowie vier Peptidthioester (**177-180**) mit jeweils zwei Tyr/pTyr-Stellen benötigt, um insgesamt alle acht SH3-Domänen herzustellen. Um Phosphotyrosin gezielt an der gewünschten Stelle einzubauen, wurde der SPPS-Baustein Fmoc-Tyr(PO(NMe₂)₂)-OH **42** verwendet (Abschnitt 2.3.2, Seite 20). Dieser wurde nach einer Vorschrift von *Chao et al.* in fünf Stufen mit einer Gesamtausbeute von 24% hergestellt.^[128] Die selbstreinigende Synthese der Peptidthioester wurde wie in Unterkapitel 4.4 (Seite 72) beschrieben durchgeführt. Die *N*-Cysteinylpeptidhydrazide wurden am Chlorotrityl-Harz analog Schema 2.6 E hergestellt. Weder bei der selbstreinigenden Peptidthioestersynthese noch bei der Hydrazidsynthese am Chlorotrityl-harz konnten signifikante Unterschiede zwischen den Peptidsynthesen mit pTyr-Baustein **42** und ohne festgestellt werden.



Schema 4.10: Syntheseübersicht zur Reaktion aller auf der Oberfläche synthetisierten (Phospho)formen der Abl-SH3-Domäne **181-188**. *i)* Immobilisierung der Cysteinylpeptidhydrazide **175** und **176**, *ii)* NCL mit entsprechenden Thioestern **177-180**.

Nach der Abspaltung vom polymeren Träger mit TFA, wurde die TFA-Lösung mit 10 vol.% Wasser versetzt und über Nacht geschüttelt, wonach die gewünschten Phosphopeptide erhalten wurden. Für die Abl-SH3-Domäne sollte an der Trp³⁶-Cys³⁷-Ver-

knüpfungsstelle die NCL auf der Oberfläche durchgeführt werden. Dafür wurden entsprechend Schema 4.10 die 39 Aminosäuren lange (Phospho)cysteinylhydrazide **175-176** im Konjugationsbuffer auf Aldehyd-funktionalisierten Platten **143** immobilisiert. Anschließend wurden die entsprechenden 21-mer (Phospho)peptidthioester **177-180** im Ligationspuffer 2 in die Vertiefungen gegeben und 16-18h bei Raumtemperatur geschüttelt. Die durch HRP-SA Analyse erhaltenen Ausbeuten sind in Tabelle 4.7 zusammengefasst.

Ähnlich wurde bei der Synthese der Arg-SH3-Domäne vorgegangen. Unter Nutzung der Arg²⁶-Val²⁷-Ligationsstelle mussten vier 32 Aminosäuren lange (Phospho)penicillaminhydrazide **189-192** sowie zwei 27 Aminosäuren lange (Phospho)peptidthioester **193-194** dargestellt werden (Schema 4.11). Die Hydrazide wurden erst immobilisiert und darauf mit den Thioestern im Ligationspuffer 2 umgesetzt. Anschließend wurden die erhaltenen V27Pen-Mutanten bei 40°C über 16 h entschweifelt. Die ermittelten Ausbeuten sind ebenfalls in Tabelle 4.7 aufgeführt.



Schema 4.11: Syntheseübersicht zur Reaktion aller auf der Oberfläche synthetisierten (Phospho)formen der Arg-SH3-Domäne **195-202**. *i)* Immobilisierung der Penicillaminhydrazide **189-192**, *ii)* NCL mit entsprechenden Thioester **193-194**, *iii)* Radikalische Entschwefelung.

Insgesamt wurden 256 Kavitäten auf drei 96-Kavitätenplatten mit 16 SH3-Domänen funktionalisiert, (8 Abl- und 8 Arg-SH3-Domänen) funktionalisiert. Die Ausbeuten variierten stark von 12% für die Y⁷Y³⁰Y⁵² Arg-SH3-Domäne **195** bis zu 80% für pY⁵² Arg-SH3-Domäne **198** Arg. Zwischen den Kavitäten, die mit den gleichen Domänen funktionalisiert wurden waren die Ausbeuten allerdings gleichmäßig verteilt (vgl. Standardabweichung in Tabelle 4.7). Der Mittelwert der Ausbeuten für alle Domänen betrug 28%.

Interessanterweise waren die Ausbeuten der Pen- Ligationen im Mittel mit 36% höher als für die Cys-Ligationen (20%).

Tabelle 4.7: Ausbeuten bezogen auf 150 pmol pro Kavität nach Funktionalisierung, Immobilisierung, Oberflächen-NCL und Entschwefelung (im Fall von Arg).

Phosphoform			Abl-SH3-Domäne			Arg-SH3-Domäne		
Y ⁷	Y ³⁰	Y ⁵²	Nr.	pmol / Kavität ^[a]	Ausbeute ^[b]	Nr.	pmol / Kavität ^[a]	Ausbeute ^[b]
-	-	-	181	26 ± 4	17%	195	18 ± 1	12%
p	-	-	182	26 ± 2	17%	196	47 ± 1	31%
-	p	-	183	29 ± 4	19%	197	75 ± 1	50%
-	-	p	184	18 ± 2	12%	198	120 ± 20	80%
p	p	-	185	52 ± 3	35%	199	19 ± 2	13%
-	p	p	186	30 ± 12	20%	200	82 ± 1	55%
p	-	p	187	26 ± 3	17%	201	37 ± 1	25%
p	p	p	188	32 ± 2	21%	202	38 ± 2	25%
Mittelwert:				30 ± 4	20%		54 ± 4	36%

[a] Stoffmenge berechnet mit Gl. 1 aus den Absorbanzen, die jeweils in 16 Kavitäten pro Domäne bestimmt wurden. Die angegebene Varianz entspricht der Standardabweichungen zwischen den 16 Kavitäten. Ausbeute berechnet mit einer maximalen Beladung von 150 pmol pro Kavität angegeben vom Hersteller sowie im Experiment (Abbildung 4.8 A) bestimmt.

Dieser Sachverhalt kann durch die schlechte Löslichkeit und die Aggregationstendenz der Abl-Thioester erklärt werden (Abschnitt 4.6.1, Seite 92). Darüber hinaus werden die Ausbeuten durch die Reinheiten der Cysteinyl- oder Penicillpeptidhydrazide bestimmt. Die Thioester wurden mit Hilfe der selbstreinigende Peptidthioestersynthese hergestellt und besaßen Reinheit zwischen 80 und 97% . Die geringste Ausbeute von 12% (18 pmol/Kavität) war ebenso für Bindungsmessungen geeignet, denn die Stoffmenge der Domänen auf der Oberfläche ist weitaus höher als den Ni-NTA Platten (maximal 9 pmol/Kavität) und 60-mal höher als die Stoffmenge der GSH-Platten (0.3 pmol/Kavität).

4.5.2 Bindungsmessungen der Phosphoformen der Abl- und Arg-SH3-Domänen an der Oberfläche

Die 14 Phospho-SH3-Domänen sowie die zwei unphosphorylierten Domänen von Abl und Arg wurden mit FAM-markierten Peptiden hinsichtlich ihrer Bindungsaffinitäten analysiert (Schema 3.1, Seite 40). Zur Analyse der phosphorylierten Abl- und Arg-SH3-Domänen wurden vier fluoreszenzmarkierte Peptide verwendet.

Für die Abl-SH3-Domäne waren drei prolinreiche Sequenzen als Interaktionspartner bekannt. Dies waren zum einen zwei native Liganden als Partialsequenzen der Adapterproteine 3BP1 und 3BP2,^[238] sowie ein artifizielles Hochaffinitätspeptid p41^[239]. Die

Interaktionen dieser drei Peptide mit der nicht-phosphorylierten rekombinanten Abl-SH3-Domäne wurden bereits von *Viguera et al.* quantifiziert.^[238] Es wurden die Affinitäten von $K_D = 34 \mu\text{M}$ für das 3BP1 Peptid und $K_D = 5 \mu\text{M}$ für das 3BP2 Peptid bestimmt.^[238] Von *Pisabarro et al.* wurde durch gezielte Mutation ein artifizielles Peptid p41 mit einer Affinität von $K_D = 1.5 \mu\text{M}$ gefunden.^[239] *Panjarian et al.* entdeckten, dass Phosphorylierung an der Position 7 (pY⁸⁹ im Volllängenprotein) innerhalb der SH3-Domäne die Bindung zu der SH2-Kinase-Interdomäne (ID) in der Abl-Tyrosinkinase stört (vgl. Abbildung 2.2, Seite 36).^[240] Bei Phosphorylierung an dieser Position wurden Kinaseaktivitäten gemessen, die einem Phänotyp entspricht bei dem die Abl-Kinase verkürzt war. In diesen Formen fehlte die SH3-Domäne oder war defekt.^[190,236b] Um den Einfluss der Phosphorylierung auf die Bindung zur Interdomäne zu untersuchen, wurde daher ebenso die prolinreiche Interdomänen-Sequenz synthetisiert und analysiert.

Es wurden die folgenden vier Peptide FAM-markiert synthetisiert und mittels Oberflächen-Fluoreszenzsättigungsanalyse in den Protein-Domänen funktionalisierten Mikrotiterplatten vermessen: Die beiden Peptide der Adapterproteine 3BP1 FAM- $\beta\text{Ala}\beta\text{Ala}\alpha\text{APTMPPLPP-NH}_2$ (**203**), 3BP2 FAM- $\beta\text{Ala}\beta\text{Ala}\alpha\text{PPAYPPPPVP-NH}_2$ (**204**), das artifizielle Peptid p41 FAM- $\beta\text{Ala}\beta\text{Ala}\alpha\text{APSYSPPPPP-NH}_2$ (**205**) sowie das Interdomänenpeptid FAM- $\beta\text{Ala}\beta\text{Ala}\alpha\text{PAPKRKNKPTVYGVSPNY-NH}_2$ (**206**).

Da für das 3BP1-Peptid (**203**) eine geringere Affinität erwartet wurde, schien es ratsam den Konzentrationsbereich auf $100 \mu\text{M}$ zu erweitern. Der Oberflächen-Bindungsassay wurde wie in Abschnitt 4.3.4 auf Seite 68 beschrieben durchgeführt. Für die Messung unterschiedlicher Binder mit den Domänen war es sehr hilfreich, dass die Domänen fest auf der Oberfläche immobilisiert waren. Somit konnte nach durchgeführter Messung eines Binders mit mehreren Domänen auf der Platte, intensiv gewaschen werden und eine weitere Messung mit einem neuen Binder durchgeführt werden. Dies ist ein großer Vorteil im Vergleich zu Methoden in Lösung. In Tabelle 4.8 sind die Ergebnisse der Oberflächen-Fluoreszenzsättigungsanalyse für die unterschiedlichen Abl- und Arg-SH3-Domänen zusammengefasst. Die Interdomänensequenz des Abl-Proteins wurde nur mit der Abl-SH3-Domäne vermessen. Die Messpunkte sowie die über hyperbole Regression ermittelten Bindungsisothermen und zugehörigen K_D -Werten sind in Kapitel 6.5 auf Seite 150 angegeben.

Zusätzlich wurden die Bindungsaffinitäten in Lösung mittels Fluoreszenzpolarisation (Abschnitt 4.6.2, Seite 97) und Tryptophan-Emission (Abschnitt 4.6.3, Seite 98) überprüft. So wurde die Affinität zu dem 3BP1-Peptid **203** zu $K_D = 40 \pm 20 \mu\text{M}$ bestimmt,

wobei *Viguera et al.*^[238] mit Hilfe von Tryptophan Emission einen Wert von $K_D = 34 \mu\text{M}$ ermittelte.

Tabelle 4.8: Bindungsaffinitäten (ermittelt als K_D in μM)^[a] der phosphorylierten und nicht-phosphorylierten humanen SH3-Domänen von Abl und Arg für prolinreichen Peptide.

Phosphoform ^[f]			Abl-SH3-Domäne				Arg-SH3-Domäne		
Y ⁷	Y ³⁰	Y ⁵²	3BP1(203)	3BP2(204)	p41 (205)	ID (206)	3BP1	3BP2	p41
-	-	-	40 ± 20 (34) ^[b] , (26 ± 15) ^[d] , (24 ± 2) ^[e]	4.4 ± 0.8 (5) ^[b] , (4.8 ± 0.7) ^[d]	1.6 ± 0.8, (1.5) ^[c] (1.7 ± 0.2) ^[d]	6 ± 1.5, (7 ± 3.7) ^[d] , (12 ± 2) ^[e]	19 ± 5	4.1 ± 0.4	1.4 ± 0.5
p	-	-	7 ± 3, (7 ± 4) ^[d] , (10 ± 1) ^[e]	5 ± 2 (5.7 ± .6) ^[d]	12 ± 5 (16 ± 4) ^[d]	kAb kAb ^{[d],[e]}	10 ± 4	4 ± 2	1.6 ± 0.9
-	p	-	12 ± 5	13 ± 6	2.4 ± 0.8	kAb	6 ± 2	7 ± 4	5 ± 2
-	-	p	7 ± 2 (6 ± 3) ^[d]	4 ± 3 (3 ± 1) ^[d]	0.7 ± 0.2 (0.6 ± 0.3) ^[d]	kAb kAb ^[d]	5 ± 2	2.4 ± 0.9	0.8 ± 0.5
p	p	-	13 ± 6	2.4 ± 0.5	1.5 ± 0.8	kAb	19 ± 10	4.4 ± 0.7	1.8 ± 0.9
-	p	p	3.0 ± 0.7 (2 ± 1) ^[d]	10 ± 3 (10 ± 6) ^[d]	0.6 ± 0.2 (0.7 ± 0.2) ^[d]	kAb kAb ^[d]	15 ± 3	6 ± 1	2.6 ± 0.7
p	-	p	kAb, kAb ^[d]	kAb, kAb ^[d]	kAb, kAb ^[d]	kAb, kAb ^[d]	kAb	kAb	kAb
p	p	p	kAb	kAb	kAb	kAb	kAb	kAb	kAb

[a] bestimmt durch Fluoreszenzsättigungs-Bindungsmessung auf der Oberfläche, die angegebene Messunsicherheit ist die Standardabweichung der hyperbolen Regression. [b] bestimmt durch *Viguera et al.*^[238] [c] bestimmt durch *Pisabarro et al.*^[239] [d] bestimmt durch Fluoreszenzpolarisation in Lösung (Abschnitt 4.6.2). [e] bestimmt durch Trp-Emission in Lösung (4.6.3) [f] Nummerierung bezieht sich auf die Position in der SH3-Domäne und nicht im Protein; kAb = keine Affinität bestimmbar.

Für die 3BP2 Sequenz **204** wurde auf der Oberfläche ein Wert von $K_D = 4.4 \pm 0.8 \mu\text{M}$ bestimmt, im Vergleich zu $5 \mu\text{M}$ ^[238]. Für das artifizielle Peptid **205** wurde ein $K_D = 1.6 \pm 0.8 \mu\text{M}$ bestimmt. *Pisabarro et al.* haben diese Affinität ebenfalls mittels Tryptophan Emission Titration zu $K_D = 1.5 \pm 0.1 \mu\text{M}$ bestimmt.^[239] Eher unerwartete Ergebnisse wurden bei der Messung der phosphorylierten SH3-Domänen erhalten. Monophosphorylierung der Abl-SH3-Domäne führte zu einer zwei bis sechsfachen Erhöhung der Affinität für den 3BP1-Ligand (**203**). Zu beachten ist, dass Doppelphosphorylierung von Y³⁰ und Y⁵² die höchste Affinitätssteigerung (um eine Größenordnung) induzierte ($K_D = 3.0 \mu\text{M}$ von pY³⁰pY⁵² gegenüber $K_D = 40 \mu\text{M}$ für die unphosphorylierte Abl-SH3-Domäne). Im Gegensatz dazu hob die gleichzeitige Phosphorylierung von Y⁷ und Y⁵² die Wechselwirkung mit jedem der getesteten Liganden auf. Bei der Interaktion mit dem 3BP2-Liganden führte die Doppelphosphorylierung zu bemerkenswerten Effekten. Während Y⁷, Y³⁰-Phosphorylierung die Bindung verbesserte, bewirkte die Phosphorylierung von Y³⁰ und Y⁵² eine Abschwächung der 3BP2-Erkennung. Dies ist aus biologi-

schem Blickwinkel interessant. Im nicht-phosphorylierten Zustand wird die SH3-Domäne den 3BP2-Liganden affiner binden als den 3BP1-Liganden. Gleichzeitige Phosphorylierung von Y³⁰ und Y⁵² schaltet die Präferenz zu 3BP1, während Y⁷Y⁵²-Doppelposphorylierung die Erkennung prolinreicher Sequenzen abschaltet. Der nachteilige Effekt des letztgenannten Phosphorylierungsmodus wurde auch für das designte p41 Peptid beobachtet. Wie bereits bei 3BP1 verzeichnet, wurde p41 durch das pY³⁰pY⁵² Protein stärker gebunden - im submikromolaren Bereich - als durch das unphosphorylierte Protein. Die einfache Phosphorylierung von Y⁷ erniedrigte allerdings die Affinität fast um eine Größenordnung von 1.6 μ M auf 12 μ M. Dies ist wiederum interessant, da die Phosphorylierung scheinbar erneut eine Feinauswahl an Bindungspartnern einstellt. In einer Mischung aus 3BP1 und p41 würde nun das 3BP1-Peptid selektiv von der pY⁷-Domäne erkannt werden, die unphosphorylierte Domäne hat allerdings eine viel höhere Affinität zu p41.

Besonders bemerkenswert ist die Tatsache, dass die Minderung bzw. Auflösung der Bindungsfähigkeit nach Phosphorylierung, welche gemäß Literaturberichten erwartet wurde, bei fünf der sieben getesteten Phosphoformen ausblieb. Lediglich die *N*- und *C*-terminal phosphorylierte Domäne, sowie die perphosphorylierte SH3-Domänen von Abl und Arg, zeigten keinerlei messbare Affinitäten zu den getesteten Liganden. Die beiden Tyrosinreste befinden sich in unmittelbarer Nachbarschaft zur Bindungsregion (Abbildung 4.19). Gleichzeitige Phosphorylierung von Y⁷ und Y⁵² könnte somit die Protein-Liganden-Erkennung hemmen. Zwei pY-Gruppen in enger Nachbarschaft könnten durch erhöhte Coulomb-Abstoßung von mindestens zwei negativen Ladungen (zweiter pKs \sim 6.7)^[241] die Bindungstasche deformieren oder ganz die Faltung der SH3-Domäne stören. Hinweise, die letztgenanntes unterstützen sind in Abschnitt 4.7 ab Seite 102 zu finden. Eine andere Möglichkeit, wäre die starke Erhöhung lokaler Polarität. Die Tyrosin-Phosphorylierung verwandelt einen relativ hydrophoben Rest in eine polare negativ geladene Gruppe, dies kann zur Abschirmung hydrophober Bindungsstellen führen. Beispielsweise wird der letzte Aktivierungsschritt der Hck-Tyrosin-Kinase laut *Schindler et al.* durch eine solche Polaritätsveränderung ausgelöst.^[242] Die katalytische Tasche dieser Kinase der Src-Familie ist in der inaktiven Form durch Try⁴¹⁶ blockiert (ebenso bei Abl, vgl. Abbildung 2.2, Seite 36). Diese Tyrosinblockade wird durch π - π -Interaktion mit einem Phe-Rest sowie durch hydrophobe Wechselwirkung mit einem anderen Phe- und Ile-Rest in Position gehalten. Nach der Phosphorylierung dreht sich der pTyr-Rest heraus und gibt den katalytischen Bereich frei.

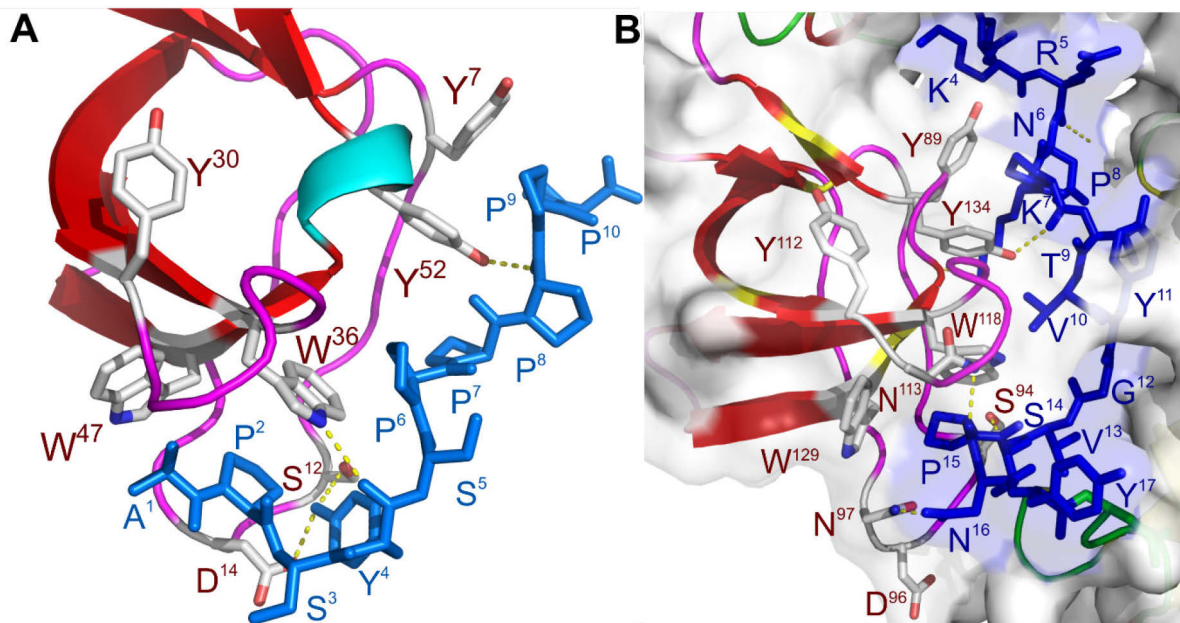


Abbildung 4.19: Röntgenkristallstruktur von Abl-SH3-Domänen (rot) im Komplex mit verschiedenen Bindern (blau). Die Seitenketten der entsprechenden Tyrosinreste und interagierender Aminosäuren sind gezeigt sowie gefundene Wasserstoffbrückenbindungen (gelb). **A:** (PDB: 1BBZ)^[239] Die SH3-Domäne mit dem p41 Peptid **B:** (PDB: 2FOO)^[243] die c-Abl-Tyrosinkinase. In der inaktiven Abl-Kinase-Form interagiert die SH3-Domäne (rot) mit der SH2/Kinase-Interdomäne (blau). (Y⁸⁹ entspricht Y⁷ in der SH3 Numerierung, Y¹¹² entspricht Y³⁰ und Y¹³⁴ entspricht Y⁵²).

Die Analyse wurde mit der Arg-SH3-Domäne ebenfalls durchgeführt und das Bindungsverhalten analysiert. Wiederum störte die Doppelposphorylierung von Y⁷ und Y⁵² die Interaktion mit den getesteten Peptidliganden. Die Arg-SH3-Domäne tolerierte andere Phosphorylierungsmoden und Phosphorylierung von Y⁵² erhöhte die Affinität für 3BP1 um das 4-fache. Die Phosphorylierung von Y⁷ führt bei der Erkennung von p41 allerdings nicht zu signifikanten Affinitätsniedrigung.

Von *Chen et al.* wurde für die Abl-SH3-Domäne beschrieben, dass Y⁷ Phosphorylierung die Interaktion mit der SH2-Kinase-Interdomäne hemmt. Daher wurde ebenfalls die Bindung zu dem Interdomänenpeptid ID **206** analysiert. In der Kristallstruktur von c-Abl belegt dieses Peptid die SH3-Bindungsfurche (Abbildung 4.19 B).^[243] Die nicht-phosphorylierte Abl-SH3-Domäne erkannte das Interdomänenpeptid ID *in trans* mit einem $K_D = 6 \pm 1.5 \mu\text{M}$. Interessanterweise war keine der Phospho-SH3-Domänen in der Lage das ID-Peptid **206** zu binden.

4.5.3 Diskussion und Fazit

In diesem Unterkapitel wurde die im Abschnitt 4.3 beschriebene Methodik gezielt genutzt, um die Phosphoregulierung der Abl- und Arg-SH3-Domänen zu untersuchen. Dabei wurde überraschendes entdeckt. Entgegen bisheriger Literaturmeinung scheinen fünf von sieben möglichen Phosphoformen der beiden Domänen in der Lage zu sein,

prolinreiche Liganden zu binden. Es wurden sogar Affinitätssteigerungen beobachtet, sechsmal bei der Abl- und viermal bei der Arg-Domäne. Insgesamt wurden 56 Interaktionen zu prolinreichen Bindern mit den beiden Domänen gemessen, 53 waren vorher unbekannt. Die Literatur-bekannten Affinitäten der Abl-SH3-Domäne konnten mit der Oberflächenmessung bestätigt werden.

Für die Abl-SH3-Domäne wurde zusätzlich die vorher unbekannte Affinität zu der SH2-Kinase-Interdomäne bestimmt. Interessanterweise hatte die Interdomänen keinerlei Affinität für die sieben phosphorylierten Domänen. Dies bestätigt auf der einen Seite die vorherige Meinung, dass Phosphorylierung der SH3-Domäne die intramolekulare Erkennung der Interdomäne stört. Auf der anderen Seite wird die Bindung zu prolinreichen Segmenten nicht generell durch Phosphorylierung der Domäne behindert. Phosphorylierte Abl-SH3-Domänen bleiben funktional und verändern darüber hinaus das Erkennungsrepertoire dahingehend, dass andere prolinreiche Proteinsegmente (wie z.B. 3BP1) bevorzugt *in trans* gebunden werden. Die Bindungsaffinität für die Peptide p41, 3BP1 und 3BP2 (**203-205**) wird durch Phosphorylierung nur geringfügig geändert (maximal eine Größenordnung, außer bei pY⁷pY⁵² und pY⁷pY³⁰pY⁵²). Mit dem Interdomänen-Peptid **206** findet keine messbare Erkennung durch die Phospho-Domänen mehr statt. Der molekulare Ursprung dieser drastischen Affinitätsunterschiede zu den phosphorylierten Domänen bleibt ungelöst. Eine mögliche Erklärung ist in dem Bindungsmodus zu finden. Aus den Röntgenkristallstrukturen der Abl-SH3-Domäne mit p41 sowie der Struktur der volllängen Abl-Tyrosinkinase mit Bindung der Interdomäne *in cis* (Abbildung 4.19) ist zu erkennen, dass das p41-Peptid ein Klasse-I-Binder ist ($C \rightarrow N$ Orientierung von oben nach unten in Abbildung 4.19). Hingegen wird die Interdomäne in der Klasse-II-Orientierung ($N \rightarrow C$) gebunden. Es sind ebenso Kristallstrukturen von Abl-SH3 mit 3BP1^[244] und der SH3-Domäne der Fyn-Tyrosinkinase mit 3BP2 bekannt. Überlagerungen dieser Kristallstrukturen mit der in Abbildung 4.19 A zeigen, dass die Liganden den gleichen Bindungsmodus in derselben Orientierung einnehmen.^[239] Die Interdomäne hingegen bildet keine typische PPII-Helix aus und bindet in der für die Abl-SH3-Domäne untypischen Klasse-II-Orientierung. Darüber hinaus sind die Sequenzen der drei Binder (**203-205**) sehr ähnlich, die Sequenz der Interdomäne weicht stark ab. So ist dort z.B. kein klassisches PXXP-Motiv zu finden. Es scheint daher erklärlich, dass Phosphorylierung die Affinität für die SH3-Binder in einer für den Bindungstyp spezifischen Weise beeinflusst. Um strukturelle Hinweise auf den molekularen Ursprung der Phosphoregulierung zu erhalten, wurden die Abl-SH3-(phospho)-Domänen außerdem mit Hilfe der NMR-Spektroskopie analysiert (Unterkapitel 4.7, Seite 102).

4.6 Vergleichende Analyse der Abl-(Phospho)SH3-Domänen in Lösung

Die dargelegten Messungen auf der Oberfläche könnten aus verschiedenen Gründen fehlerhafte Werte ergeben haben. Da die korrekte Faltung nicht überprüft wurde, könnten nicht- oder fehlgefaltete Domänen zu einem falsch-negativen Ergebnis geführt haben. Darüber hinaus könnten unspezifisch adsorbierte Thioester oder die immobilisierten Abbruchsequenzen des *C*-terminalen Fragments Artefakte erzeugen. Ein Vergleich mit Messungen in Lösung ist daher hilfreich. Mittels NMR-Spektroskopie kann die Faltung der Proteine untersucht werden. Mit der Methode der Fluoreszenzpolarisation können Bindungsaffinitäten in Lösung verlässlich bestimmt werden. Außerdem kann bei der Abl-SH3-Domäne die durch Bindung induzierte Änderung der Tryptophan-Emission gemessen und so Bindungsaffinitäten für markierungsfreie Peptide bestimmt werden.

Solche Messungen erfordern große Mengen an SH3-Domäne (50 - 200 nmol pro Messung). Zum Vergleich, die Oberflächenmethode benötigt 2.4 nmol pro Domäne für alle Messungen. Um darüber hinaus eine Gegenüberstellung der neuen Oberflächen-Methodik mit der konventionellen Protein-Domänensynthese durchzuführen, wurden ausgewählte SH3-Domänen nach publizierten Verfahren hergestellt. Diese Verfahren beinhalteten eine Reinigung durch die HPLC. Es kann somit zusätzlich zur Bestimmung der Bindungsaffinitäten in Lösung ermittelt werden, in wie weit die Synthese und Analyse auf der Oberfläche Zeit einspart.

4.6.1 Vergleichende Synthese der Abl-(Phospho)SH3-Domänen in Lösung

Typischerweise umfasst die „konventionelle konvergente Proteinsynthese“ die folgenden Schritte: (1.) Synthese und (2.) Reinigung des *C*-terminalen Peptidfragments; (3.) Synthese und (4.) Reinigung des Peptidthioesters (*N*-terminales Fragment); (5.) NCL und (6.) Reinigung des Ligationsprodukts. Bei Verwendung der Erweiterten NCL folgt (7.) Entschwefelung oder Auxiliarentfernung und (8.) Reinigung der nativen Sequenz.

Im Gegensatz zu den sechs oder acht sukzessiv linearen Schritten der konventionellen Proteinsynthese, benötigt die Oberflächensynthese nur vier parallele Schritte (fünf wenn Entschwefelung verwendet werden muss). Alle Schritte können, durch den Verzicht auf die HPLC-Reinigung, parallel betrieben werden.

Zunächst wurde versucht, die Abl-SH3-Domäne linear zu synthetisieren. Vier Versuche schlugen trotz der Verwendung von Pseudoproline fehl.

In den Versuchen, die SH3-Domäne in Lösung mittels konventioneller konvergenter Synthese herzustellen, war die Aufreinigung das Hauptproblem. Die geringe Löslichkeit der Thioesterfragmente erschwerte die Reinigung, da hohe Konzentrationen nicht erreicht werden konnten. Ein Beispiel für Reinigungsprobleme aufgrund der geringeren Löslichkeit des Thioesterfragments sind in Abbildung 4.20 gezeigt.

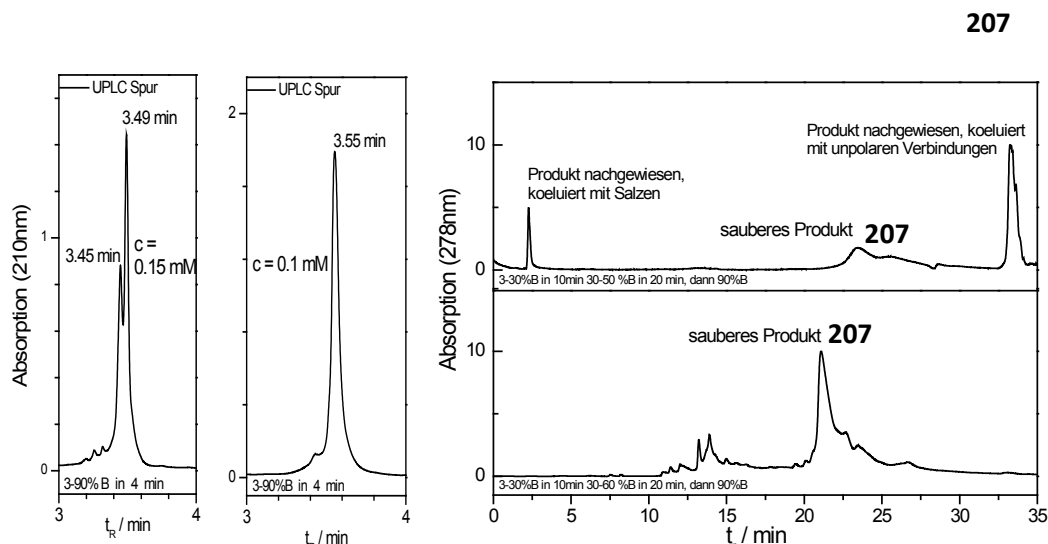


Abbildung 4.20 A: Sequenz des *N*-terminalen Fragments der Abl-SH3-Domäne als Peptidhydrazid **207**, welches nach Fang *et al.* in einen Thioester umgewandelt werden kann.^[100] **B:** Chromatogramm des Peptids **207** gelöst in H₂O/ACN/TFA (49.5:49.5:1) bei einer Konzentration von 0.15 M und 0.1 M (**C**). Die geringere Signalintensität in **B** resultiert aus Präzipitation. **D:** Vergleich zwischen Reinigungsversuchen bei denen das Peptid **207** in 5 ml 6M GdmCl Lösung (oberes Chromatogramm), oder in 1 ml TFA/H₂O (3:1) (unteres Chromatogramm) gelöst wurde.

Zunächst wurden benötigte *N*-terminale Fragmente nach dem *safety-catch* Prinzip als Methyl-3-mercaptopropionat Thioester synthetisiert. Diese waren allerdings sehr schwer löslich. In ACN/Wasser/TFA (1:1:0.1%) konnte keine Konzentrationen über 50 μ M erreicht werden. Die für die Ligation wünschenswerte Konzentration von 100 μ M konnten nur in 3 M GdmCl-Lösung erreicht werden. Es wurde daher als Thioestervorstufen Peptidhydrazide verwendet, da diese eine verbesserte Löslichkeit versprochen. Dennoch präzipitierten auch diese Peptide bei Konzentrationen größer als 0.1 mM. Dies ist am Beispiel des Hydrazids **207** illustriert (Sequenz: Abbildung 4.20 A). Beim Chromatogramm in Abbildung 4.20 B wurde das Peptid in einer Konzentration von 0.15 M aufgegeben. Bei dieser Konzentration ist Präzipitation zu beobachten, außerdem sind zwei Peaks im Chromatogramm erkennbar, die sich nicht in dem dazu gehörigen Massenspektrum unterscheiden. Bei einer 0.1 mM Konzentration des Peptids **207** ist nur ein Peak bei einer Retentionszeit von 3.55 min zu sehen (Abbildung 4.20 C), die Massenspektren aller drei beobachteten Peaks entsprechen der molekularen Masse des Pep-

tids **207** (4184.32 m/z gefunden (dekonv.), 4184.66 g/mol berechnet). Das Absorptionssignal bei 3.45 min in Abbildung 4.20 B könnte ein Aggregationsdimer sein, welches sich bei der Ionisierung im Elektronenspray trennt. Die hohe Aggregationsneigung dieser *N*-terminalen Fragmente erschwerte die Aufreinigung mittels HPLC. Die zu reinigenden Substanzen werden idealerweise in möglichst kleinen Volumina des Laufmittels auf die chromatographische Säule gebracht. Bei der Reinigung des Peptids **207** oder der entsprechenden Phosphoformen (**211-213**) konnten keine Konzentration über 0.1 mM im HPLC Laufmittel erreicht werden. Es wurde daher versucht durch Zugabe chaotroper Salze die Löslichkeit der Peptide zu erhöhen. Hohe Konzentrationen (> 5 M) von Harnstoff oder GdmCl ermöglichten das Peptid in eine Konzentration von 2 mM zu überführen. Allerdings führte die Verwendung der chaotropen Salze zu sehr hohen Produktverlusten. Dieser Sachverhalt ist exemplarisch an Hand des oberen präparativen HPLC Chromatogramms in Abbildung 4.20 D gezeigt. Bei der gemessenen Absorption von 278 nm wird hauptsächlich peptidisches Material detektiert. In dem ersten Peak bei 2.5 min konnte Produkt nachgewiesen werden, hier eluiert das Produkt vermutlich zusammen mit dem chaotropen Salz, da bei 210 nm eine sehr hohe Absorption und nach der Gefriertrocknung weißes kristallines Material zu beobachten war. Danach eluiert bei 24 min das Produkt ohne Verunreinigungen. Nach 30 min wird 5 Minuten lang mit 90% ACN gespült wobei bei 34 min ebenfalls Produkt eluiert, welches mit vielen hydrophoben Nebenprodukten verunreinigt war. Nach Elution des GdmCl präzipitiert das Produkt vermutlich teilweise. Das gelöste Produkt eluiert rein nach 24 min. Erst bei 90% ACN wird das präzipitierte Produkt langsam wieder gelöst und eluiert nach 34 min mit vielen anderen unpolaren oder nicht vollständig gelösten Substanzen. Da lediglich die Produktfraktion nach 24 min reines Produkt beinhaltet war die Ausbeute bei Löslichkeitsvermittlung mit GdmCl sehr niedrig (3%). Ein ähnliches Verhalten wurde bei der Verwendung chaotroper Lösungsmittel wie DMF, DMSO und TFE beobachtet, wobei der größte Verlust an Produkt in diesen Fällen im ersten Peak zwischen 2 und 4 min zu beobachten war. Einzig die zu Hilfenahme von TFA lieferte zufriedenstellende Ergebnisse. So wurde das Rohprodukt **207** (15 µmol) in 3 ml TFA/H₂O (3:1) gelöst und mittels präparativer HPLC gereinigt. Das untere Chromatogramm in Abbildung 4.20 D zeigt das Reinigungsverhalten bei Verwendung von TFA. TFA führte weder zur Koelution im Bereich von 2-4 min noch zur späten Elution nach 30 min. Somit konnte eine große saubere Produkt-Fraktion um 22 min erhalten werden. Die Ausbeute betrug hierbei 23%.

Die restlichen Thioestervorstufen (**211-213**) wurden ebenfalls mit TFA als Kosolvenz gereinigt. Anschließend wurde die Synthese der Domänen in Lösung versucht. Es wurde die nach *Fang et al.* publizierte Methode der Thioestergenerierung ausgehend von Peptidhydraziden verwendet.^[100] Die durchgeführten Synthesen sind exemplarisch an Hand der Synthese der unphosphorylierten Domäne **210** in Abbildung 4.21 gezeigt. Dabei wurde das Peptidhydrazid **207** mit NaNO₂ zum Peptidazid **208** umgesetzt. Zugabe von 50 mM Thiol (Thiophenol (PhSH) oder 4-Mercaptophenylelessigsäure (MPAA)) im Ligationspuffer 3 (0.2 M NaH₂PO₄, 6 M GdmCl, 50 mM PhSH/MPAA, pH 7) erzeugten den Aryl-Thioester **209**. Dieser wurde mit dem Cysteinylpeptid **175** im Ligationspuffer zur gewünschten SH3-Domäne **210** umgesetzt. Anfängliche Versuche, die in Schema 4.12 aufgeführten (Phospho)SH3-Domänen in Lösung herzustellen zeigten, dass zwei Parameter für den Erfolg der Synthese entscheidend sind: Zum einen müssen die Reaktanten während der Azid-Generierung homogen gelöst sein. So wurde in den ersten Versuchen die Reaktionslösung lediglich in Plastikgefäßen geschüttelt. Dies führte zu einem unvollständigen Reaktionsumsatz. Zusätzlich war die Hydrolyse des Azids **208** zur Peptidsäure zu beobachten.

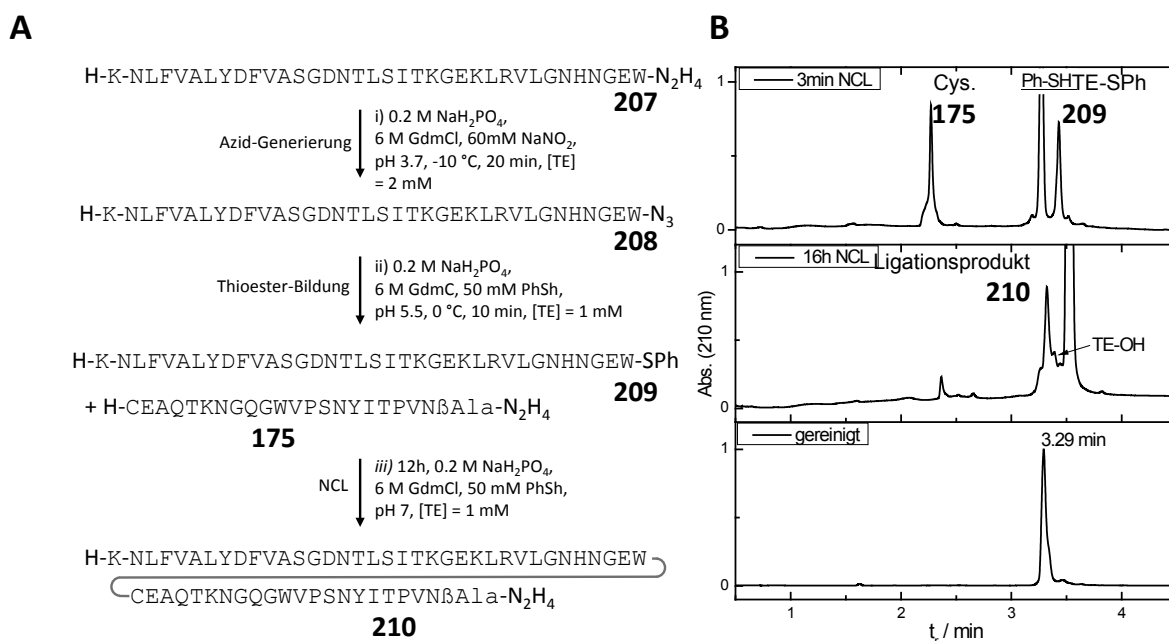


Abbildung 4.21 A: In-situ Thioestergenerierung nach *Fang et al.*^[100] mit anschließender NCL in Lösung zur Abl-SH3-Domäne. **B:** Überwachung der Reaktionsfolge mittels UPLC-MS. Die annotierten Spezies konnten an Hand ihres Massenspektrums und Ihrer Retentionszeit zugeordnet werden.

Starkes Rühren erhöhte hingegen den Umsatz und erniedrigte die Menge an Nebenreaktionen deutlich. Der zweite wichtige Parameter ist die Generierung des Thioesters vor der Zugabe des Cysteinylpeptids und Einstellung des pH-Wertes. Laut den erwähn-

ten Veröffentlichungen von *Fang et al.* soll das Cysteinylpeptid im thiolhaltigen Ligationspuffer zu dem Peptidazid gegeben werden. Anschließend wird der pH-Wert eingestellt. Bei dieser Reaktionsfolge kam es bei pH-Werten unter 5 entweder zu Oxidation des Cysteinylpeptids, oder bei pH-Werten über 8 zu Hydrolyse des Azids oder Thioesters. Wird allerdings der thiolhaltige Ligationspuffer bei 0°C zu dem Peptidazid gegeben, resultiert der pH = 5. Trotzdem verläuft die Thioestergenerierung sehr rasch (< 1 min) und Nebenprodukte werden in geringerem Ausmaß gebildet. Anschließend wurde der pH-Wert auf 7 eingestellt und das Cysteinylpeptid im Ligationspuffer hinzugegeben. Als Thiole wurden für den thiolhaltigen Ligationspuffer, wie von *Fang et al.* beschrieben MPAA und Thiophenol verwendet. Obwohl die Verwendung von MPAA leicht erhöhte Ligationsgeschwindigkeiten zeigte, war die Aufreinigung der Ligationsprodukte, die mit MPAA erhalten wurden, problematisch, denn MPAA neigt zur Koelution mit Ligationsprodukten.^[245]



Schema 4.12: Reaktionsüberblick aller in Lösung synthetisierten Phosphoformen der Abl-SH3-Domäne analog zu Abbildung 4.21. *i)* Thioestergenerierung aus den Peptidhydraziden durch NaNO₂ und PhSH oder MPAA im thiolhaltigen Ligationspuffer (welches Thiol siehe Tabelle 4.9), *ii)* NCL mit entsprechenden Cysteinylpeptiden im thiolhaltigen Ligationspuffer.

Wurden kleinere Produktmengen (< 100 nmol) aufgereinigt konnten Produktverluste minimiert werden.

Eine Übersicht der hergestellten Abl-(Phospho)SH3-Domänen ist in Tabelle 4.9 zusammengestellt. Bei Verwendung von Thiophenol als Thioladditiv wurden Stoffmengen zwischen 200 – 342 nmol erhalten, wobei die Ausbeuten mit 35 – 44% zufriedenstellend waren. Bei kleineren Syntheseansätzen konnte auch bei der Verwendung von MPAA Ausbeuten zwischen 27 – 38% verzeichnet werden. Die Synthese mit Thiophenol lieferte ausreichend Substanz (200 nmol) für eine NMR-spektroskopische Analyse der SH3-Domänen (Abschnitt 4.7, Seite 102).

Tabelle 4.9: Ausbeuten der Synthese in Lösung der Abl-(Phospho)SH3-Domänen

Phosphoform			Abl-SH3-Domäne			
Y ⁷	Y ³⁰	Y ⁵²	Nr.	Stoffmenge ^[a]	verwendetes Thiol	Ausbeute ^[b]
-	-	-	210	278 nmol	PhSH	35%
p	-	-	214	342 nmol	PhSH	41%
-	-	p	215	27 nmol	MPAA	27%
-	p	p	216	38 nmol	MPAA	38%
p	-	p	217	220 nmol	PhSH	44%
p	p	p	218	200 nmol	PhSH	40%

[a] Stoffmenge berechnet durch die Absorption der gereinigten Produkte bei 278 nm. [b] Ausbeute bezogen auf die im Unterschuss eingesetzte Menge an Cysteinylpeptid.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Synthese der sechs Abl-(Phospho)SH3-Domänen (**210**, **214-218**) durch konventionelle Synthese in etwa ein Jahr in Anspruch nahm. Dahingegen gelang die Synthese der 16 Arg- und Abl-SH3-Domänen auf der Oberfläche in nur vier Monaten.

4.6.2 Bindungsmessungen der Abl-(Phospho)SH3-Domänen mittels Fluoreszenzpolarisation in Lösung

Um die Bindungsaffinitäten der Abl-(Phospho)SH3-Domänen mit den prolinreichen Peptiden (**203-206**) in Lösung zu bestimmen, wurden Fluoreszenzpolarisationsmessungen durchgeführt.

FAM-markierte Peptide (**203-206**) wurden in konstanter Konzentration (9 nM) in Mikrotiterplatten vorgelegt und wurden mit steigenden Konzentrationen (0 - 100 μ M von (Phospho)Domänen (**210**, **214-217**) in FP-Puffer versetzt. Die Mischung wurde drei Stunden inkubiert, um die Faltung der Domänen zu ermöglichen. Die Ergebnisse der Bindungsaffinitäten (Bindungsisothermen als K_D in μ M) welche durch hyperbole Regression nach Gl. 2 (Seite 68) ermittelt wurden, ist in Tabelle 4.10 zusammengefasst. Außerdem sind die Werte in Tabelle 4.8 auf Seite 88 im Kontext der Oberflächenbestimmten Werte eingetragen. Überdies sind die Amplituden (dyn. B. in Δ mP) der Bindungsisothermen angegeben. Der dynamische Bereich der Messungen variierte zwischen 5 bis 115 Δ mP. Werte über 10 Δ mP sind wünschenswert, da sich damit das Signal-Rausch-Verhältnis verbessert. Werte unter 10 Δ mP wurden bei den Messungen mit ID und der unphosphorylierten Domäne sowie bei 3BP1 mit pY⁷ erhalten. Diese Binder wurden daher erneut in Lösung mittels Tryptophan-Emission gemessen (Abbildung 4.22).

Tabelle 4.10: Affinitäten der phosphorylierten und der nicht-phosphorylierten humanen SH3-Domänen von Abl für prolinreiche FAM-markierte Peptide in Lösung, ermittelt mit Hilfe von Fluoreszenzpolarisation (als K_D in μM)^[a].

Phosphoform			3BP1(203)		3BP2 (204)		p41 (205)		ID (206)	
Y ⁷	Y ³⁰	Y ⁵²	K_D ^[a]	dyn. B. ^[b]	K_D ^[a]	dyn. B. ^[b]	K_D ^[a]	dyn. B. ^[b]	K_D ^[a]	dyn. B. ^[b]
-	-	- 210	26 ± 9	57 ± 15	4.8 ± 0.7	115 ± 15	1.7 ± 0.2	74 ± 2.4	7 ± 3.7	5 ± 1.4
p	-	- 214	7 ± 4.4	8 ± 2.2	5.7 ± 0.6	116 ± 6	16 ± 3.8	74 ± 14	kAb	---
-	-	p 215	6 ± 1.4	13 ± 1.3	3.0 ± 1.2	10 ± 1.2	0.7 ± 0.2	28 ± 1.5	kAb	---
-	p	p 216	2 ± 1.3	13 ± 2.1	10 ± 6.5	15 ± 5	0.7 ± 0.2	12 ± 0.9	kAb	---
p	-	p 217	kAb	---	kAb	---	kAb	---	kAb	---

[a] K_D ermittelt über nichtlineare Regression an Gl. 2 von 12 Messpunkten mit Standardabweichung. [b] Aus der Regression erhaltene Amplitude (dyn. B. in ΔmP) welche als Maß der Güte der Messung verwendet werden kann.^[246] kAb = keine Affinität bestimmbar.

Bindungsmessungen mit dynamischen Bereichen über 10 ΔmP und K_D -Werte bei denen die Standardabweichung kleiner als der K_D -Wert war, wurden als ausreichend gut für einen Vergleich mit den vorher bestimmten Werten herangezogen. Die in Lösung bestimmten Werte zeigten innerhalb der Messunsicherheit eine gute Übereinstimmung mit den Messdaten, welche mit Hilfe der Fluoreszenzsättigungsanalyse auf der Oberfläche erhalten wurden.

4.6.3 Bindungsmessungen der Abl-(Phospho)SH3-Domänen mit unmarkierten Peptiden in Lösung mittels Tryptophan-Emission

Die Röntgenkristallstruktur der Abl-SH3-Domäne zeigt einen Tryptophanrest in der Bindungsregion (Abbildung 4.19). Es schien daher aussichtsreich, die Bindungsaktivität durch Messungen der Tryptophan-Emission zu charakterisieren. Vorteilhaft ist hierbei, dass Interaktionen zu unmarkierten prolinreichen Peptiden gemessen werden können.

Tryptophan hat ein Absorptionsmaximum bei 280 nm und die Emission ist stark von der räumlichen Umgebung abhängig.^[247] Die Fluoreszenzintensität und die Emissionswellenlänge (300 – 350 nm) ändert sich mit der Polarität der direkten Umgebung des Tryptophanrests.^[247] Das Emissionssignal kann als Observable für die Messung von Bindungsisothermen verwendet werden, wenn die Ligandeninteraktion in räumlicher Nähe stattfindet. Ist diese Bedingung erfüllt, wird im Allgemeinen mit steigender Konzentration eines Binders eine Blauverschiebung des Emissionsmaximums sowie eine Verringerung des Fluoreszenzsignals beobachtet.^[247]

Die Abl-(Phospho)SH3-Domänen wurden in 2 μM Konzentration vorgelegt und mit steigenden Konzentrationen der folgenden unmarkierten Peptide behandelt: 3BP1' H-APTMPPLPP-NH₂ (**219**) und ID' H-PAPKRNKPTVYGVSPNY-NH₂ (**220**). Die Messung der Interaktion zwischen der unphosphorylierten Domäne **207** und dem 3BP1'-Peptid

219 ist exemplarisch in Abbildung 4.22 gezeigt. In den Fluoreszenzspektren verschob sich das Emissionsmaximum bei steigender Konzentration des 3BP1'-Peptids **219** von $\lambda_{\max}^0 = 349$ nm zu $\lambda_{\max}^{\text{Sät.}} = 335$ nm. Die maximale Fluoreszenzintensität verringerte sich von $I_{\max}^0 = 881$ a.u. zu $I_{\max}^{\text{Sät.}} = 605$ a.u. bei der Sättigungskonzentration des Peptids.

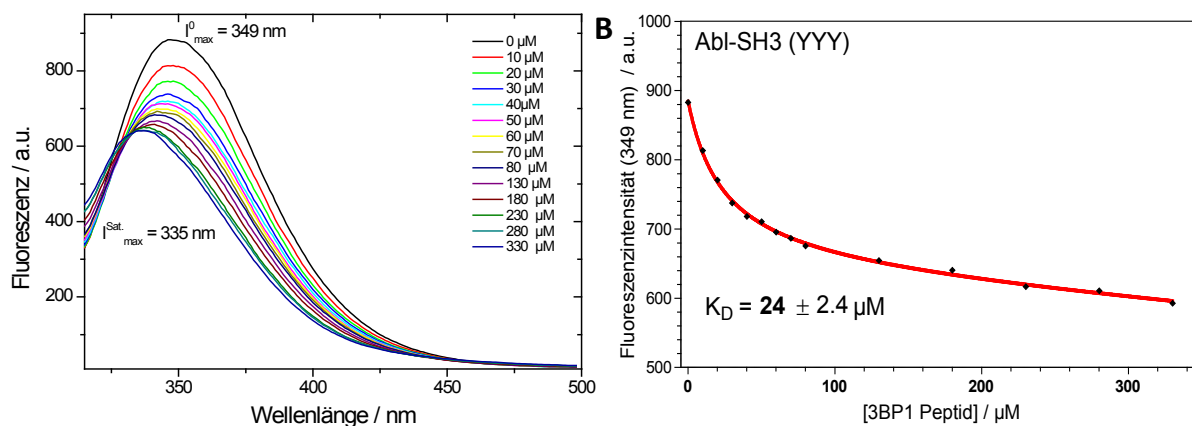


Abbildung 4.22 A: Fluoreszenz der Abl-SH3-Domäne Y⁷Y³⁰Y⁵² **210** mit steigenden Konzentrationen des 3BP1'-Peptids **219**. **B:** Auftragung der Fluoreszenzintensität bei 349 nm mit steigender Konzentration des Peptids **219**.

Es wurden die Fluoreszenzintensitäten bei 349 nm während der Titration mit den Peptiden (**219**, **220**) als Observable verwendet. Die Peptide wurde im Konzentrationsbereich von 0 – 330 µM zu einer 2 µM Lösung der Domänen (**210**, **214**) gegeben. Die erhaltenen Messpunkte aus zwei Messungen wurden gemittelt und es wurde eine hyperbole Regression nach Gl. 2 (Seite 68) zur Bestimmung der Bindungsisothermen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.11 aufgeführt. Für die Interaktion des unmarkierten Peptids von 3BP1' **219** wurde dabei ein $K_D = 24 \pm 2.4$ µM ermittelt. Die Blauverschiebung der Emissionsmaxima ist mit dem Wert $\lambda_{\max}^{\text{Sät.}}$ angegeben. Die stärkste Blauverschiebung zeigt die Bindung der Y⁷Y³⁰Y⁵²-Domäne **210** mit dem 3BP1' Peptid **219** von 14 nm, gefolgt von der Interaktion desselben Binders mit der pY⁷ Domäne **214** von 8 nm. Die Verschiebung bei der Bindung von des ID' Peptids **220** mit der Y⁷Y³⁰Y⁵² Domäne **210** betrug 7 nm. Die Bindungsmessung von ID' mit der pY⁷ Domäne **214** zeigte keinerlei Verschiebung des Emissionsmaximums. Es waren große Unterschiede in den Fluoreszenz-Intensitäten (I_{\max}^0) zu beobachten. Bei den Affinitäts-Messungen von ID' **220** musste eine Anregungswellenlänge von mindestens 305 nm eingestellt werden.

Tabelle 4.11: Bindungsaffinitäten ermittelt mit Hilfe von Tryptophan-Emission (als K_D in μM)^[e] der phosphorylierten und nicht-phosphorylierten humanen SH3-Domäne von Abl für prolinreiche nicht-markierte Peptide in Lösung.

Phosphoform			3BP1'(219) ^[a]				ID' (220) ^[b]			
Y ⁷	Y ³⁰	Y ⁵²	$\lambda_{\text{max}}^{\text{Sät.}}$ ^[c]	I_{max}^0	$\Delta I_{\text{max}}/I_{\text{max}}^0$ ^[d]	K_D ^[e]	$\lambda_{\text{max}}^{\text{Sät.}}$ ^[c]	I_{max}^0	$\Delta I_{\text{max}}/I_{\text{max}}^0$ ^[d]	K_D ^[e]
-	-	- 210	335 nm	881 a.u.	-31.3%	24 ± 2.4	342 nm	318 a.u.	-17.9%	12 ± 2
p	-	- 214	341 nm	805 a.u.	-33.5%	10 ± 1.4	349 nm	157 a.u.	-3.2%	kAb

[a] Anregungswellenlänge 300 nm. [b] Anregungswellenlänge 305 nm (um eine Tyrosinanregung im Liganden zu vermeiden) (bei [a] und [b]: Schlitzbreite_{Ex.} 10 nm, Schlitzbreite_{Em.} 10 nm). [c] Wellenlänge des Emissionsmaximums an Ende der Titration. Das Emissionsmaximum zu Beginn der Titration lag immer bei $\lambda_{\text{max}}^0 = 349$ nm. [d] Prozentuale Erniedrigung der Intensität des Emissionsmaximums ($\Delta I_{\text{max}} = I_{\text{max}}^{\text{Sät.}} - I_{\text{max}}^0$). [e] K_D ermittelt durch hyperbole Regression von 14 Messpunkten; kAb = keine Affinität bestimmbar.

Bei niedrigeren Anregungswellenlängen überlagerte die Tyrosin-Emission des Liganden bei hohen Konzentrationen das Tryptophan-Signal der Domänen. Bemerkenswerterweise war bei $\lambda_{\text{ex.}} = 305$ nm der Intensitäts-Unterschied zwischen unphosphorylierter und einfach phosphorylierter Domäne relativ stark ausgeprägt. Die pY⁷-Domäne zeigte im Emissionsmaximums lediglich 50% der Fluoreszenzintensität die bei der Y⁷Y³⁰Y⁵²-SH3-Domäne gemessen wurde. Diese Beobachtung kann mit einer Emissionslöschung des Tryptophans erklärt werden. Diese ist bekannt für ionische Gruppen in der Nachbarschaft des Tryptophans.^[248] Dagegen spricht, dass bei einer Anregung von 300 nm kein großer Intensitätsunterschied zu beobachten war. Daher könnte die Phosphorylierung für eine Blauverschiebung des Absorptionsspektrums gesorgt haben, so dass in der pY⁷-Domäne eine geringere Extinktion bei 305 nm stattfand als bei der Y⁷Y³⁰Y⁵²-Domäne. Die Bindung von 3BP1' reduzierte die Signalintensität die Trp-Emission der unphosphorylierten Domäne um 31%. Die Interaktion mit pY⁷-SH3-Domäne führt zu einer Absenkung um 34%. Während bei der Bindung von ID' mit der Y⁷Y³⁰Y⁵²-Domäne eine 18-prozentige Reduktion beobachtet wurde. Bei der Addition von ID' zu pY⁷ war lediglich eine Reduzierung um 3% zu beobachten. Die K_D -Werte die durch Trp-Emission erhalten wurden stimmten innerhalb der Standardabweichung mit Werten überein die für die 3BP1 Sequenz auf der Oberfläche gemessen wurden. Der Wert für ID' in Lösung ($K_D = 12 \pm 2$ μM) war allerdings höher, als auf der Oberfläche für ID bestimmt ($K_D = 6 \pm 1.5$ μM). Da die Messung der Fluoreszenzpolarisation den Wert für die Fluoreszenzsättigungstitration auf der Oberfläche bestätigen konnte ($K_D = 7 \pm 4$ μM), ist ein Einfluss der FAM-Markierung oder des verwendeten β -Alanin-Abstandshalters denkbar.

4.6.4 Diskussion und Fazit

Um die interessanten Ergebnisse der Fluoreszenzsättigungsanalyse auf der Oberfläche des Abschnittes 4.5.2 zu bestätigen, wurden zuerst die Abl-SH3 (Phospho)Domänen

nach konventionellen Verfahren in Lösung hergestellt. Die Synthese inklusive Synthesefindung und Optimierung von sechs Abl-(Phospho)SH3-Domänen (**210**, **214-218**) hat insgesamt ein Jahr in Anspruch genommen, wobei die Synthese und Analyse von 16 Abl- und Arg-(Phospho)SH3-Domänen auf der Oberfläche lediglich vier Monate bedurfte (inklusive Syntheseoptimierung). Dieser große Zeitunterschied ist im Wesentlichen auf die Notwendigkeit der HPLC-Reinigung bei der konventionellen Synthese zurückzuführen. Dabei kam es zu Aufreinigungsproblemen. Es wurden weiterhin in diesem Unterkapitel die Affinität für FAM-markierte sowie unmarkierte Peptide in Lösung bestimmt. Die Messungen mit den FAM-markierten Peptiden lieferten innerhalb der Messunsicherheit vergleichbare Werte wie die Fluoreszenzsättigungsmessungen auf der Oberfläche. Die Bindungsanalyse mit den markierungsfreien Bindern 3BP1' und ID' konnte die oberflächengemessenen Werte für 3BP1' nicht aber für ID' reproduzieren. Die Messungen in Lösung mit unmarkierten Peptiden zeigten für die Bindung zu der Interdomäne (ID') einen doppelt so hohen K_D -Wert im Vergleich zur Oberflächenmessung mit FAM-Markierung. Die FAM-Markierung könnte im Fall der Y⁷Y³⁰Y⁵² Domäne zu einer unnatürlichen Bindungsverstärkung führen, die sich in einer Affinitätssteigerung um mindestens Faktor 2 äußert ($K_D = 6 \mu\text{M}$ mit FAM-Markierung ggü. $12 \mu\text{M}$ ohne Markierung).

Außer den zweideutigen Ergebnissen mit ID' konnten alle auf der Oberfläche gemessenen Daten mit anderen Methoden bestätigt werden. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die am Anfang des Kapitels erwähnten möglichen Fehlerquellen (Nichtfaltung oder unspezifische Bindung) die Werte auf der Oberfläche nicht beeinflussen.

4.7 Evaluierung der Abl-(Phospho)SH3-Domänen mittels NMR

Die bisher in den Unterkapiteln 4.5 und 4.6 dargestellten Ergebnisse legen nahe, dass gezielte Phosphorylierung als eine Feinregulierung von SH3-Domänen dienen kann, die Affinitäten für bestimmte prolinreiche Binder verstärkt und für andere abschwächt. Es könnte somit von einem Phosphoschalter oder einer Phosphoregulierung gesprochen werden.

Um die Funktionsweise der Phosphoregulierung zu untersuchen, wurden NMR-spektroskopische Messungen mit den (Phospho)SH3-Domänen allein und in Interaktion mit Liganden durchgeführt.

4.7.1 Strukturelle Charakterisierung der Abl-(Phospho)SH3-Domänen

Es wurden wie in Kapitel 4.6.1 beschrieben größere Mengen (> 200 nmol) (Phospho)SH3-Domänen hergestellt. Außerdem wurde die Abl-SH3-Domäne rekombinant mit Hilfe von biotechnologischen Methoden gewonnen. Dafür wurde die Domäne als GST-Fusionsprotein exprimiert und nach erfolgreicher Reinigung durch die *Human Rhinovirus 3C Protease* innerhalb der eingebauten LEVLFG/GPLGS Sequenz zwischen den beiden Glycinen durchtrennt, wobei eine 71 Aminosäuren lange Sequenz erhalten wurde. Es wurden von dieser rekombinanten und den folgenden anderen Abl-SH3-Domänen ^1H -NMR-Spektren aufgenommen: $\text{Y}^7\text{Y}^{30}\text{Y}^{52}$ **210**, pY^7 **214**, $\text{pY}^7\text{pY}^{52}$ **217** und $\text{pY}^7\text{pY}^{30}\text{pY}^{52}$ **218** (Abbildung 4.23). Beim Vergleich waren besonders Verschiebungen im Tieffeld mit ppm-Werten über 8 ppm und im Hochfeld von unter 0.5 ppm interessant. Die Signale über 8 ppm sind hauptsächlich Resonanzen der Amidprotonen, die auf Grund der Proteinfaltung vom Magnetfeld weniger gut abgeschirmt werden. Die Signale im extremen Hochfeld sind Methylgruppen zuzuordnen, die ebenfalls auf Grund der Faltung stark abgeschirmt sind. Somit können diese Signale als Indikatoren für die Proteinfaltung dienen.^[249] In einer denaturierten Form, erzeugen diese Protonen Signale bei einer anderen Verschiebung (Abschnitt 4.7.2, Seite 104).

Die rekombinante Abl-SH3-Domäne zeigte ein ähnliches ^1H -NMR-Spektrum wie die chemisch synthetisch hergestellte Domäne $\text{Y}^7\text{Y}^{30}\text{Y}^{52}$ (Abbildung 4.23). Besonders interessant sind die beiden Signale bei 10.05 ppm. Diese Signale können den Protonen der Indol-*NH*-Gruppe der beiden Tryptophanreste zugeordnet werden. Die Signale sind bei der rekombinanten, der $\text{Y}^7\text{Y}^{30}\text{Y}^{52}$ - und der pY^7 -Domäne ähnlich. Im Spektrum der $\text{pY}^7\text{pY}^{52}$ - und der $\text{pY}^7\text{pY}^{30}\text{pY}^{52}$ -Domäne ist ein zusätzlicher Peak bei 10.04 ppm zu beobachten, welches bei der perphosphorylierten Domäne dominant ist.

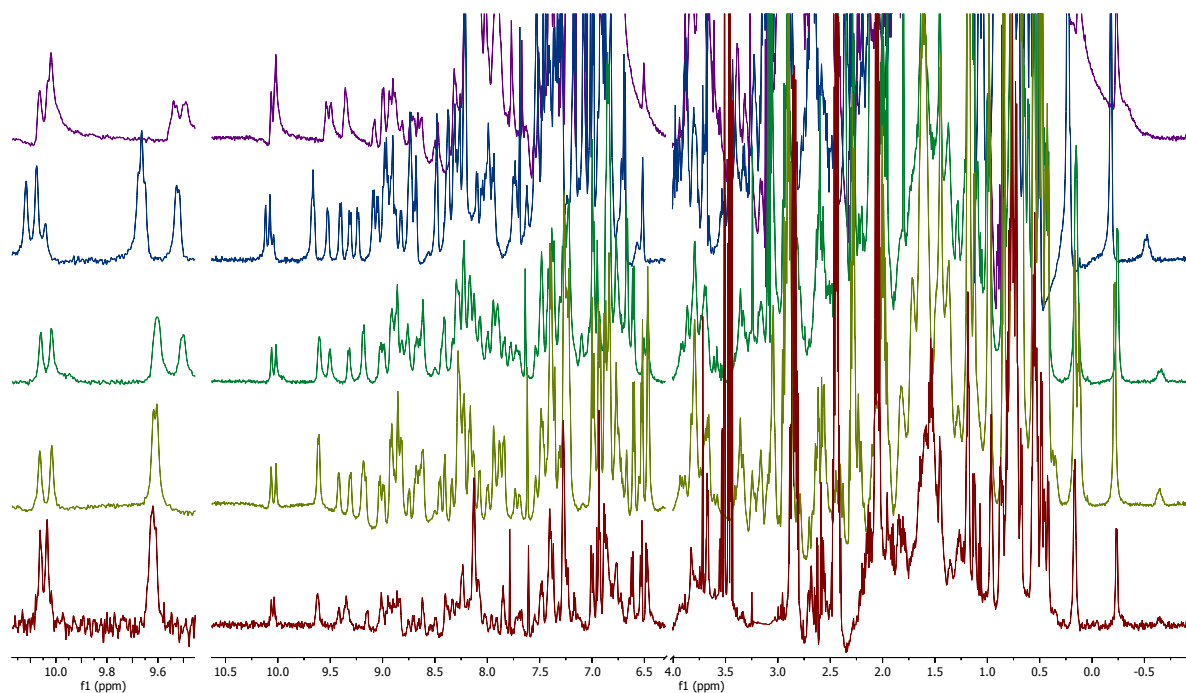


Abbildung 4.23: Vergleich der ^1H -NMR-Spektren der rekombinant hergestellten Abl-SH3-Domäne mit den chemisch synthetisch gewonnenen Abl-(Phospho)SH3-Domänen. $\text{Y}^{12}\text{Y}^{35}\text{Y}^{57}$ Numerierung entsteht durch den fünf Aminosäuren längeren *N*-Terminus der rekombinanten Sequenz, die SH3-Domäne ist sequenzidentisch.

Eine solche Signalaufspaltung wurde von *Zhang et al.* für eine Mischung zweier Zustände bei der SH3-Domäne des *drk*-Proteins aus *Drosophila* beschrieben.^[250] Im 50 mM PBS Puffer waren zwei Tryptophansignale zu beobachten, obwohl sich nur ein Tryptophanrest in der Sequenz befindet. Nach der Addition von bis zu 500 mM Natriumsulfat kumulierten beide Signale. Das zusätzliche Signal wurde durch einen nicht-gefalteten oder fehlgefalteten Zustand erklärt. Auch in den vorliegenden Spektren der Phospho-Domänen $\text{pY}^7\text{pY}^{52}$ und $\text{pY}^7\text{pY}^{30}\text{pY}^{52}$ könnte das zusätzliche Signal von einem entfalteten oder fehlgefalteten Zustand stammen. Für eine entfaltete Struktur spricht, dass im denaturierten Zustand beide Tryptophanreste ein isochrones Signal liefern (Abschnitt 4.7.2). Weitere charakteristische Signale sind die Amidsignale zwischen 9.6 und 9.1 ppm. Das Amidsignal bei 9.6 ppm ist bei allen Domänen außer der perphosphorylierten sehr intensiv und nur bei der $\text{pY}^7\text{pY}^{52}$ -Domäne zu 9.7 ppm verschoben. Die drei Methyl-Signale bei 0.16 ppm, -0.22 ppm und -0.63 sind klare Indikatoren einer ähnlichen Faltung, wobei letzteres Signal bei der rekombinanten Domäne sehr schwach ausgeprägt und bei der $\text{pY}^7\text{pY}^{52}$ Domäne um -0.53 ppm verschoben ist. Die Signalunterschiede zwischen exprimierter Domäne und $\text{Y}^7\text{Y}^{30}\text{Y}^{52}$ sind vermutlich auf die zehn zusätzlichen *N*-terminalen und sechs *C*-terminalen Aminosäuren zurückzuführen. In der Region der Amidsignale (7.5 - 9 ppm) sind deutliche Unterschiede zwischen den Domänen zu sehen.

Die beiden Tryptophansignale können als Maß für die Faltung verwendet werden.^[250] Ein isochrones Signal wird vermutlich durch eine Entfaltung im Bereich der Tryptophane erzeugt. Nach Berücksichtigung der Tryptophan- und Methylsignale kann geschlossen werden, dass die rekombinante, die Y⁷Y³⁰Y⁵²- und pY⁷-Domäne sich in einem gefalteten Zustand befinden. Das Integral des dritten Tryptophansignals (10.04 ppm) der pY⁷pY⁵²- und pY⁷pY³⁰pY⁵²-Spektren wurde zunächst als Maß für eine Ent- oder Fehlfaltung verwendet. Die pY⁷pY⁵²-Domäne befindet sich demnach mit 21% in einem ent- oder fehlgefalteten Zustand. Die pY⁷pY³⁰pY⁵² Domäne würde demnach zu 81% in einem solchen Zustand vorliegen. Die Unterschiede in den Amidsignalen zwischen den Domänen deuten auf eine geringfügig veränderte Faltung hin. Die mangelnde Feinaufspaltung zwischen 9 und 10.5 ppm sowie die verhältnismäßig große Intensität im aromatischen Bereich (6.5 – 8.5 ppm) bei der pY⁷pY⁵²- und besonders prägnant der pY⁷pY³⁰pY⁵²-Domäne unterstreichen die These, dass diese beiden Domänen teilweise entfaltet vorliegen. Da Veränderungen der Tryptophansignale auch durch Protonenaustausch mit dem Lösungsmittel verändert werden können, wurde zusätzlich das Methylsignal bei 0.1 ppm als Observable verwendet. Dieses Signal kann nur durch ein gefaltetes Protein hervorgerufen werden.^[249] Es wurde das Verhältnis des Integrals dieses Peaks zu dem Integral aller Peaks in einem abgetrennten aromatischen Bereich bestimmt (6.2 - 7.1 ppm). Dieses Verhältnis betrug 1 zu 4.5 bei der rekombinanten und 1 zu 4.6 bei der synthetischen Y⁷Y³⁰Y⁵² Domäne. Daher wurde der Mittelwert (4.55) als Verhältnis einer vollständig gefalteten Domäne angenommen. Die Phospho-Domänen zeigten folgende Verhältnisse: pY⁷ = 5.0 (93% Faltung), pY⁷pY⁵² = 5.6 (83% Faltung) und pY⁷pY³⁰pY⁵² = 18 (26% Faltung). Diese Verhältnisse sind in Übereinstimmung mit den Verhältnissen, die auf Basis der Tryptophansignale ermittelt wurde.

4.7.2 Schmelzverhalten der Abl-(Phospho)SH3-Domänen ermittelt durch ¹H-NMR Spektroskopie

Die ¹H-NMR-Spektren der vier Domänen (Y⁷Y³⁰Y⁵² **210**, pY⁷ **214**, pY⁷pY⁵² **217** und pY⁷pY³⁰pY⁵² **218**) wurden im NMR-Rohr bei unterschiedlichen Temperaturen gemessen. Die Temperatur wurde dabei in 5 K Schritten von 288 K (15 °C) auf 343 K (70 °C) erhöht. Die Veränderungen der ¹H-Signale wurden im Vergleich zum Ausgangs-Spektrum (288 K) beobachtet. Abbildung 4.24 zeigt die Spektren der Abl-SH3-Domäne pY⁷pY⁵² (links) und pY⁷pY³⁰pY⁵² (rechts) im gemessenen Temperaturbereich und nach Abkühlung auf Raumtemperatur. Diese beiden Domänen sind hier gezeigt, da sie nicht

bindungsfähig waren. Die Spektren der restlichen Domänen sind in Abbildung 6.6 und Abbildung 6.7 (Seite 183) zu finden.

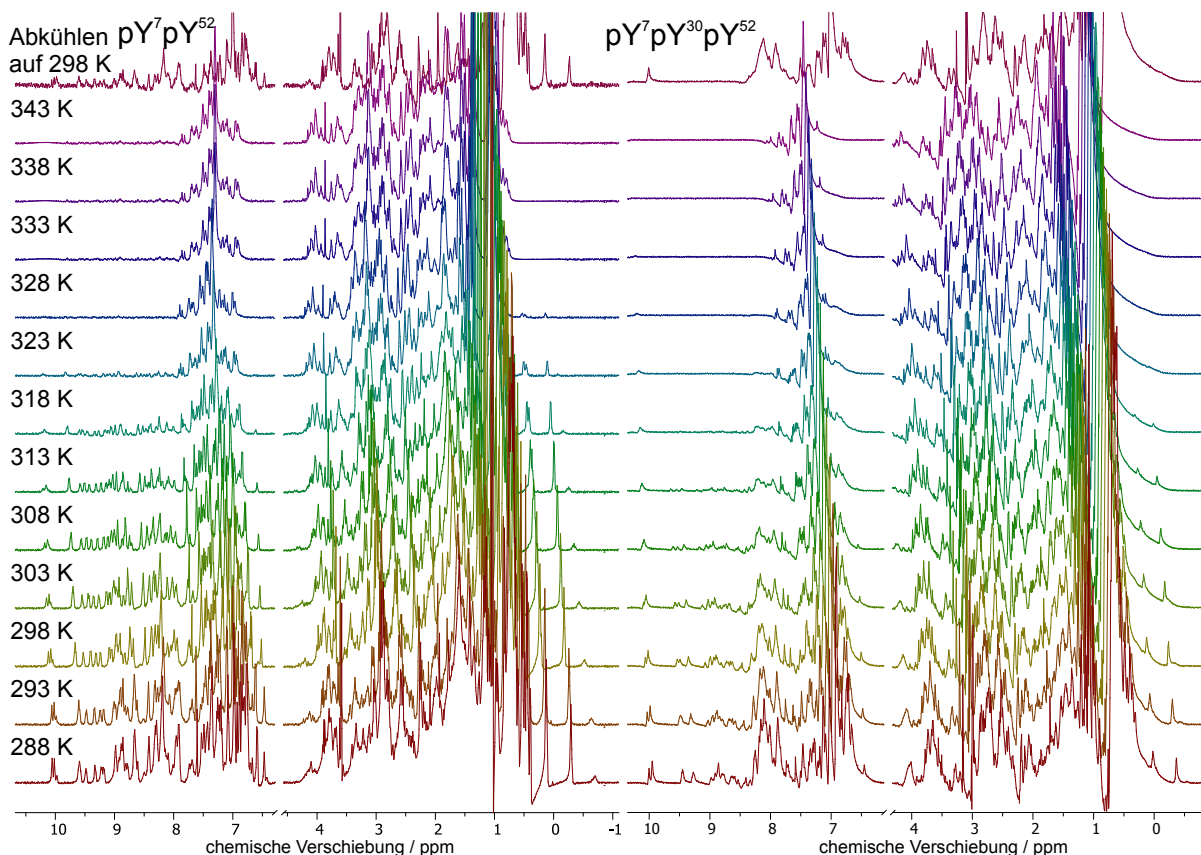


Abbildung 4.24: ^1H -NMR-Spektren der Abl-SH3-Domäne $\text{pY}^7\text{pY}^{52}$ (links) und $\text{pY}^7\text{pY}^{30}\text{pY}^{52}$ (rechts) im Temperaturbereich von 288 K bis 343 K, erwärmt in 5 K Schritten, sowie das ^1H -NMR-Spektrum nach Abkühlung auf Raumtemperatur (oben).

Zunächst ist auffällig, dass das in Abschnitt 4.7.1 diskutierte Trp-Signal bei 10.04 ppm (9.95 ppm bei 288 K), welches als Indikator für Fehlfaltung angesehen wird, mit steigender Temperatur zunimmt. Der Anteil bewegt sich bei der $\text{pY}^7\text{pY}^{52}$ Domäne von 13% (288 K), 21% (298 K), 60% (308 K) bis zu 100% bei 318 K. In der Domäne $\text{pY}^7\text{pY}^{30}\text{pY}^{52}$ ist diese Transformation ebenfalls zu beobachten: 73% (288 K), 81 % (298 K) und 100% bei 308 K. Dies spricht für die Theorie, dass das im Prozentsatz steigende Singulett-Signal die beiden isochronen *N*-Indolprotonen der Tryptophanreste einer entfalteten Domänenstruktur entsprechen. Ebenso bemerkenswert ist, dass sich nach der Abkühlung auf Raumtemperatur (30 min) andere Anteile an diesem Peakflächen einstellen, als vor dem Temperaturzyklus. So zeigt die Domäne $\text{pY}^7\text{pY}^{52}$ 68% (298 K) und die $\text{pY}^7\text{pY}^{30}\text{pY}^{52}$ 100% Anteil an Ent- oder Fehlfaltung. Die Amid- und Methyl-Signale, die durch Faltung Hoch- oder Tieffeld verschoben sind verschwinden ab 333 K bei $\text{pY}^7\text{pY}^{52}$ und ab 323 K bei $\text{pY}^7\text{pY}^{30}\text{pY}^{52}$ vollständig. Nach der Abkühlung erscheinen die Signale bei der $\text{pY}^7\text{pY}^{52}$ Domäne allerdings wieder. Dennoch unterscheiden sich die

Signale stark vom Anfangszustand. Bei der $pY^7pY^{30}pY^{52}$ -Domäne tauchen lediglich die Signale um 8 ppm wieder auf. Es ist anzunehmen, dass das Fehlen der Signalintensität bei erhöhten Temperaturen vermutlich auf einen beschleunigten Protonenaustausch der Amidprotonen mit dem Lösungsmittel zurückzuführen ist. Denkbar ist, dass die perphosphorylierte Domäne nach dem Abkühlen vollständig entfaltet ist. Um Schmelztemperaturen (bei halbtotale Entfaltung T_m) zu bestimmen, wurde das Methylsignal bei -0.2 ppm als Observable gewählt. Dieser Peak war während der Erwärmung aller vier gemessenen synthetischen Abl-SH3-Domänen deutlich sichtbar. Darüber hinaus kann dieses Signal nicht durch Protonenaustausch reduziert werden. Das Methylsignal wurde in allen vier chemisch synthetischen und der rekombinanten SH3-Domäne bei sehr ähnlicher Verschiebung (Δ 0.06 ppm) gefunden. Da dieser Peak nur durch Faltung erzeugt wird, kann er für die Beobachtung einer Zustandsänderung von gefaltet zu entfaltet verwendet werden. Die Signalintensität (Peakhöhe) wurde bei den jeweiligen Temperaturen bestimmt und die maximale Intensität wurde auf eins normiert. Die so erhaltenen 12 Datenpunkte der vier Domänen sind in Abbildung 4.25 A dargestellt.

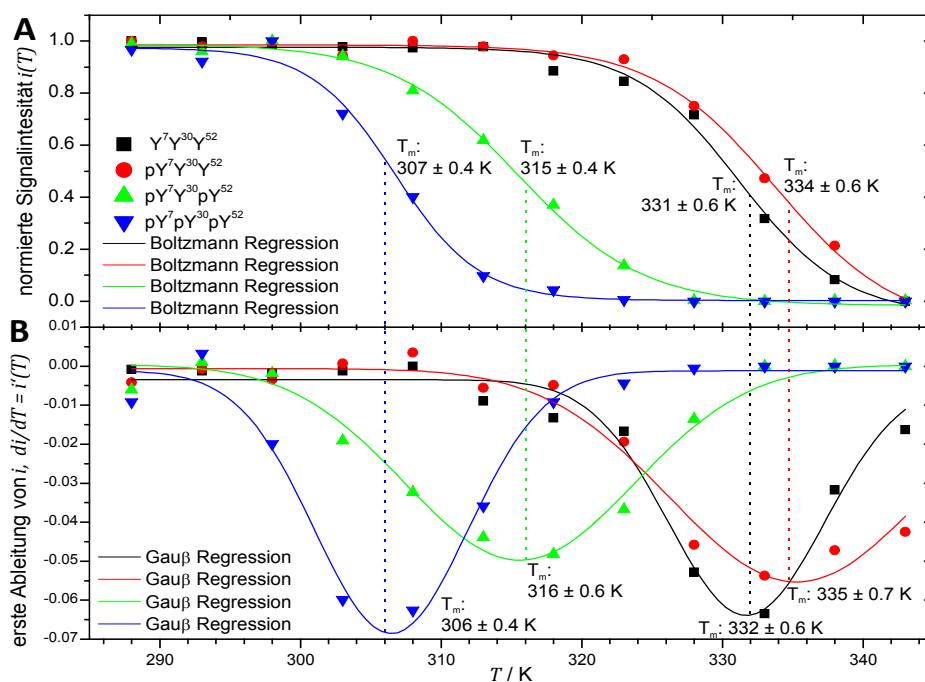


Abbildung 4.25 A: Auftragung der Messpunkte der Signalintensität $i(T)$ der Methylgruppe bei einer chemischen Verschiebung von -0.2 ppm mit steigender Temperatur, sowie Boltzmann Annäherung (Gl. 3) an diese Punkte. **B:** Erste numerische Ableitung von $i(T)$ zu $i'(T)$ der Messpunkte aus A und Regression nach der Gauß Gl. 4.

Ein Kurvenverlauf wurde über nichtlineare Regression der *Boltzmann*-Gleichung (Gl. 3) angenähert. Die wichtigsten erhaltenen Koeffizienten sowie das Bestimmtheitsmaß sind in Tabelle 4.12 eingetragen und die Kurven der *Boltzmann*-Annäherung $i(T)$ sind in Abbildung 4.25 A gezeigt.

$$i(T) = A_2 + \frac{(A_1 - A_2)}{(1 + e^{(T - T_m)/dx})} \quad (\text{Gl. 3})$$

Die Messpunkte wurden außerdem numerisch integriert und die so bestimmten Datenpunkte mittels der Gleichung 4 nach *Gauß* einem Kurvenverlauf $i'(T)$ angenähert (Abbildung 4.25 B). Die erhaltenen Schmelzpunkte (T_m), das Bestimmtheitsmaß und die berechneten Peakbreiten (w) sind in Tabelle 4.12 zu finden.

$$\frac{d}{dT} i(T) = i'(T) = I_0 + \frac{A}{w\sqrt{\pi/2}} e^{-2\frac{(T - T_m)^2}{w^2}} \quad (\text{Gl. 4})$$

Tabelle 4.12: Schmelztemperaturen (T_m) der chemisch synthetisch hergestellten Abl-(Phospho)SH3-Domänen.

Phosphoform			<i>Boltzmann</i> Regression von <i>i</i>		<i>Gauß</i> Regression der ersten Ableitung von <i>i</i>		
Y ⁷	Y ³⁰	Y ⁵²	T _m / K ^[a]	R ²	T _m / K ^[a]	R ²	Kurvenbreite <i>w</i> / K ^[b]
-	-	- 210	331.2 ± 0.6	0.992	331.7 ± 0.4	0.953	5.5 ± 0.5
p	-	- 214	333.8 ± 0.6	0.996	335.3 ± 0.7	0.959	9.0 ± 0.9
p	-	p 217	315.5 ± 0.4	0.997	315.6 ± 0.5	0.957	8.2 ± 0.7
p	p	p 218	306.7 ± 0.4	0.994	306.5 ± 0.4	0.964	5.4 ± 0.4

[a] Schmelztemperatur ermittelt über Kurven-Annäherung an 12 NMR-spektroskopisch bestimmte Messpunkte mittels Boltzmann Gl. 3 oder angenähert an die erste Ableitung durch die Gauß Gl. 4. Kurvenbreite bei halber Peakhöhe.

Die erste Auffälligkeit bei der Betrachtung der Ergebnisse ist die Tatsache, dass die Schmelztemperatur mit Ausnahme von pY^7 mit steigender Anzahl an Phosphatgruppen abnimmt. Die Schmelzpunktermittlung über die Regression nach Gl. 3 zeigte ein höheres Bestimmtheitsmaß ($R^2_\emptyset = 0.995$) im Gegensatz zu der T_m Bestimmung über die erste Ableitung und Kurven-Annäherung nach Gl. 4 ($R^2_\emptyset = 0.958$). Im Folgenden werden die Schmelzwerte verwendet die durch die Gl. 3 nach *Boltzmann* erhalten worden sind. Die geringste Schmelztemperatur mit 307 K (34°C) weist die perphosphorylierte Domäne auf. Bei 316 K (43°C) ist die flankiert phosphorylierte pY^7pY^{52} Domäne halb entfaltet. Nach einem Abstand von 15 K folgt die unphosphorylierte Domäne mit einem $T_m = 331$ K (58 °C). Drei Kelvin erhöht ist die Schmelztemperatur der einfach Y^7 phosphorylierten Domäne $T_m = 334$ K (61 °C). Dies ist interessant, wenn die Schmelztemperatur als Maß der Stabilität betrachtet wird. Die pY^7 -Domäne ist demnach etwas stabiler gefaltet als die unphosphorylierte Domäne. Die Y^7 -Phosphorylierung ruft eine geringe strukturelle Veränderung hervor (Abbildung 4.23), welche die Domäne um drei Kelvin stabilisiert. Die Phosphorylierung an *N*- und *C*-Terminus scheint die SH3-Domäne allerdings zu destabilisieren, da der T_m um mehr als 15 K sinkt. Ein anderer Faltungszustand ist bei den Domänen pY^7pY^{52} und $pY^7pY^{30}pY^{52}$ schon bei Raumtemperatur vorhanden und dieser Zustand wird nach dem Abkühlen noch stärker populiert.

Es ist daher davon auszugehen, dass die Phosphorylierung der Tyrosine Y⁷ und Y⁵², welche sich im gefalteten Zustand (Abbildung 4.19), in räumlicher Nähe befinden, die Faltung stören. Es kann vermutet werden, dass besonders die Bindungsregion durch die Phosphorylierung destabilisiert wird, da sich diese beiden Tyrosine in der Bindungsregion befinden. Einfache Phosphorylierung des Y⁷-Rests stabilisiert die Faltung geringfügig. Im Gegensatz zu der Möglichkeit, dass Phosphorylierung Fehlfaltung auslöst, wie beispielsweise für das Tau-Protein bekannt,^[251] kann nicht davon ausgegangen werden, dass Phosphorylierung die Domäne prinzipiell destabilisiert. Es müssten allerdings die Schmelztemperaturen aller Phosphoformen gemessen werden, um den Effekt von Anzahl und Position der Phosphorylierung auf die Stabilität ganzheitlich diskutieren zu können.

4.7.3 Ligandeninteraktion mit Abl-(Phospho)SH3-Domänen im ¹H-NMR

Um die Schaltmechanismen der Phosphoregulierung auf molekularer Ebene besser verstehen zu können, wurden NMR-Bindungs-Titrationsexperimente durchgeführt. Dazu wurden die Domänen Y⁷Y³⁰Y⁵² **210** und pY⁷ **214** (137 µM) in Interaktion mit den unmarkierten Liganden 3BP1' **219** und ID' **220** (0-276 µM) gemessen. Es wurden dabei ¹H- und ³¹P-NMR-Spektren bei unterschiedlichen Verhältnissen von Domäne zu Ligand gemessen. Die faltungsrelevante Tieffeldregion (7.8 – 10.2 ppm) der erhaltenen Spektren ist in Abbildung 4.26 dargestellt. Außerdem sind die ³¹P-Spektren im Verschiebungsbe- reich der Phosphatgruppe für die pY⁷ Domäne abgebildet. Auffällig waren die Verschiebungen der Signale der *N*-Indolprotonen der Trp-Reste. Bei der Bindung von 3BP1' mit Y⁷Y³⁰Y⁵² verschob sich das Tryptophansignal bei 10.1 ppm um insgesamt 0.15 ppm ins Tieffeld (Abbildung 4.26 A). Das zweite Tryptophansignal zeigte keine Verschiebung, aber eine Erhöhung der Intensität. Ebenfalls wurde das Signal bei ursprünglich 9.61 ppm um 0.2 ppm Tieffeld-verschoben. Ein ähnliches Verhalten ist bei der Bindung von 3BP1' mit der pY⁷ Domäne zu beobachten. In diesem Fall zeigt das Trp-Indol-Proton bei ursprünglich 10.1 ppm eine kleinere absolute Verschiebung von 0.05 ppm und kumuliert mit dem zweiten Indolproton (Abbildung 4.26 B). Das zweite sich stark verändernde Signal ist das Amidsignal bei 9.57 ppm welches sich bei höheren Konzentrationen von 3BP1' insgesamt um 0.18 ppm Tieffeld verschob. Die Verschiebung der Phosphatgruppe änderte sich um 0.07 ppm. Bei der Interaktion von ID' mit der unphosphorylierten Abl-SH3-Domäne (Abbildung 4.26 C) verschoben sich interessanterweise beide Tryptophansignale in das Hochfeld. Das Signal bei 10.64 veränderte sich um 0.08 ppm und das Signal bei 10.02 ppm um 0.05 ppm. Die faltungsspezifischen

Amidsignale und die Methylsignale verschoben sich nur minimal. Bei der ID'-Interaktion mit der pY⁷ Domäne war lediglich die Verschiebung der Tryptophansignale um 0.01 ppm in das Hochfeld zu verzeichnen (Abbildung 4.26 C). Das Phosphatsignal blieb unverändert.

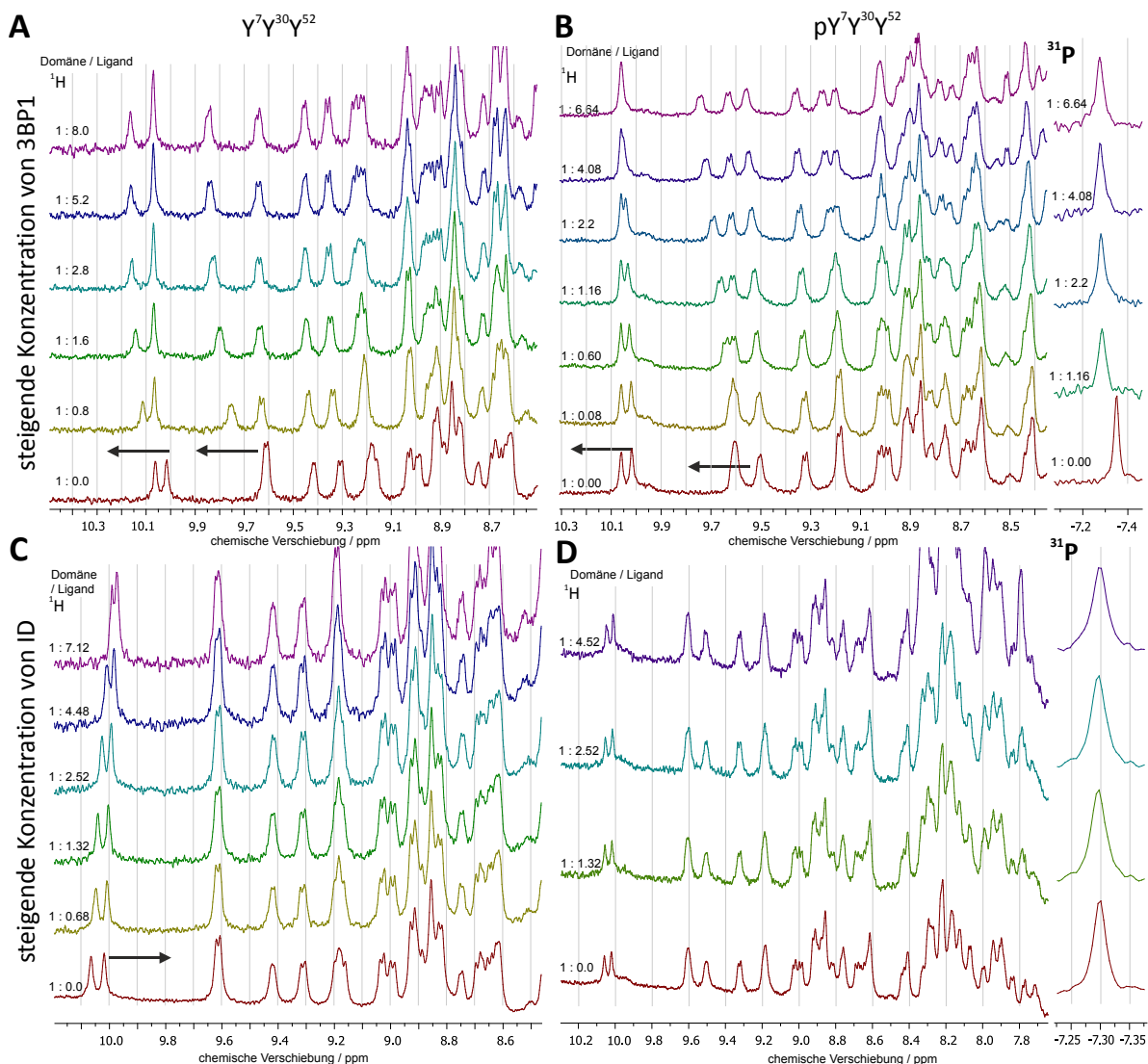


Abbildung 4.26: ¹H-NMR Spektren der Titrationsexperimente der unmarkierten Binder 3BP1' **219** (oben) und ID' (unten) **220** mit den Domänen (137 μM) Y⁷Y³⁰Y⁵² (links) und pY⁷ (rechts). Die Pfeile zeigen die stärksten Signalverschiebungen an.

Auf Grundlage der Verschiebungswerte können Affinitäten berechnet werden. Die Regression wurde mit Gl. 2 (Seite 68) durchgeführt. Für die Interaktion von 3BP1' mit der Y⁷Y³⁰Y⁵²-Domäne errechnete sich bei der Verwendung des Signals mit der anfänglichen Verschiebung von 10.10 ppm, ein $K_D = 87 \pm 12 \mu\text{M}$. Bei der pY⁷-Domäne mit 3BP1' und unter Berücksichtigung des Signals bei 9.57 ppm, ergab sich ein $K_D = 52 \pm 18 \mu\text{M}$. Die Bindungsisotherme die durch Messung des 10.64 ppm-Signals der Y⁷Y³⁰Y⁵²-Abl-SH3-Domäne mit ID' gewonnen wurde lieferte einen Wert von $K_D = 108 \pm 58 \mu\text{M}$.

Die Regressionskurven sind im Anhang 10.3 auf Seite 245 zu finden. Für die sehr geringe Verschiebung der ID'-pY⁷-Domänen-Interaktion konnte keine Affinität bestimmt werden.

Die K_D-Werte waren höher als in Lösung und auf der Oberfläche bestimmt (Tabelle 4.8). Eine Ursache für die abweichenden Werte könnten die Konzentrationsunterschiede sein. Die NMR-Messungen fanden bei einer Domänen-Konzentration von 137 µM statt. Die vorherigen Messungen wurden bei großer Verdünnung der Domänen oder des Liganden (FP) durchgeführt. Für die Messungen der Domänen auf der Oberfläche kann keine Konzentration angegeben werden. Eine Interaktion der Domänen ist aber durch die Oberflächenverankerung unwahrscheinlich. Bei den FP-Messungen war die Ligandenkonzentration niedrig (9 nM) und die Domänen-Konzentration wurde bis maximal 90 µM erhöht. Die Trp-Emission wurde bei einer 2 µM Domänen-Konzentration gemessen. Die NMR-Messung zeigte allerdings ebenso eine starke Erniedrigung der Affinität für ID' nach Phosphorylierung (pY⁷). Dahingegen lässt die Phosphorylierung die Affinität für 3BP1' intakt oder erhöht diese sogar.

4.7.4 Diskussion und Fazit

Interessante Details zur Phosphoregulierung konnten durch die NMR-Experimente erhalten werden. Zum einen wurde bei Vergleich der ¹H-NMR-Spektren der einzelnen (Phospho)Domänen deutlich, dass die Phosphorylierung strukturelle Änderungen induziert. Bei Perphosphorylierung und flankierender *N*- und *C*-terminaler Phosphorylierung sind die strukturellen Änderung stärker als bei einfacher Phosphorylierung, was sich besonders im Tryptophansignal äußert. Dieses kann als Maß für die Struktur der Bindungsregion herangezogen werden. Ähnliche Werte für das Verhältnis an gefalteter zur nicht- oder fehlgefalteter Domäne wurden unter Verwendung eines Methylsignals erhalten.

Die Interaktion mit dem 3BP1'-Binder hat sich besonders stark auf ein Tryptophan-Signal ausgewirkt (Tieffeld-Verschiebung). Bei der Bindung mit ID' wurden allerdings beide Trp-Signale Hochfeld-verschoben. Bezüglich der SH3-3BP1-Interaktion kann vermutet werden, dass die in der Röntgenkristallstruktur sichtbare Bindung nach Klasse-I (vgl. Abbildung 4.19 A auf Seite 90 für p41 gezeigt) ebenso im NMR-Experiment in Lösung stattfindet. Für die Bindung des 3BP1'-Liganden mit der Abl-SH3-Domäne existiert ebenfalls eine Kristallstruktur, die sehr ähnlich der Struktur in Abbildung 4.19 A ist (PDB: 1ABO).^[244] Das Bindungsverhalten im NMR-Experiment ist vermutlich ähnlich dem in der Kristallstruktur, da dort für die SH3-p41 und 3BP1-Interaktion eine

Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Trp³⁶ der Domäne und dem Carbonyl-Sauerstoffatom der Tyr⁴-Ser⁵ Amidbindung gefunden wurde. Das Trp⁴⁷ ist nicht in der direkten Nachbarschaft des Liganden. Dies erklärt die Verschiebung nur eines Trp-Signals bei der Bindung mit dem 3BP1'-Peptid. Bei der Erkennung der Interdomäne kam es zur Verschiebung beider Trp-Signale. Dies ist verwunderlich, da in der Kristallstruktur (Abbildung 4.19 B), ähnlich wie bei der besprochenen Struktur mit 3BP1', lediglich das Trp¹¹⁸ in direkter Nähe zum Ligand liegt. Trp¹²⁹ könnte eventuell mit Asn¹⁶ wechselwirken, da die Interdomäne an dieser Stelle in der Kristallstruktur durch die Verbindung zur SH2-Domäne vom Trp¹²⁹ weggedreht wird. Bei einer Bindung *in trans* kann das ID'-Peptid sich zu Trp¹²⁹ hindrehen und mit diesem interagieren. Die Beobachtung, dass sich beide Trp-Signale zum Hochfeld verschieben, ist ein Indiz dafür, dass die Interaktion in einer anderen Art stattfindet als mit 3BP1'. Vermutlich wird das Peptid in einer Klasse-II-Konformation entsprechend der Kristallstruktur gebunden. *Pisabarro et al.* beschreiben, dass der *N*-terminale Abschnitt von p41 und der 3BP1 Sequenz mit einem hydrophoben *C*-terminalen Bereich der Abl-SH3-Domäne bindet und so für Bindungsverstärkung zusätzlich zum PXXP-Motiv sorgt.^[239] Der *C*-Terminus aber auch der *N*-Terminus der SH3-Domäne besitzen hydrophobe Aminosäuren. Beide bilden einen großen hydrophoben Bereich der sich im Inneren der Domäne zwischen dem W⁴⁷ und Y⁵²-Rest befindet. Dieser hydrophobe Kern beinhaltet beide Trp, drei Val, Phe, Leu und Ile. Dieser Bereich könnte für die Bindung der Interdomäne eine Rolle spielen. Die Interdomäne besitzt ein VYGV- Motiv, das in der Kristallstruktur an diesen hydrophoben Kern angenähert ist. Die Verschiebung beider Trp-Signale ist ein Indiz dafür, dass die Interdomäne mit diesem Bereich der Domäne wechselwirkt.

Darüber hinaus kann angenommen werden, dass ID' im Gegensatz zu 3BP1' weniger stark mit den Amidprotonen der SH3-Domäne wechselwirkt, da dort kaum Verschiebungen stattfanden. Das am stärksten verschobene Amidsignal bei der Interaktion zwischen 3BP1' und der pY⁷-Domäne war das Signal bei 9.6 ppm. Interessanterweise war dies auch das Signal was im strukturellen Vergleich zwischen der Y⁷Y³⁰Y⁵² und pY⁷-Domäne in der phosphorylierten Domänen am meisten Tieffeld-verschoben war. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Phosphorylierung eine geringe Strukturänderung hervorruft, die die Bindung zu 3BP1' verstärkt, denn 3BP1' wechselwirkt besonders mit diesem strukturell veränderten Amidproton. Eine mögliche Erklärung für die Verschiebung des ³¹P Signals der Phosphatgruppe bei der 3BP1'-pY⁷-Interaktion wäre eine oder mehrere Wasserstoffbrückenbindungen zum Liganden bei Annäherung.

Der destabilisierende Effekt der Doppel- und Dreifach-Phosphorylierung auf die Faltung der SH3-Domänen, der sich besonders an den Schmelztemperaturen beobachten lässt, kann durch eine erhöhte Ladung und Polarität erklärt werden. Die fünf β -Faltblätter werden in der Hauptsache durch hydrophobe Wechselwirkung im Kern zusammengehalten. Diese Interaktion könnte mit steigender Ladung und Polarität gestört werden. Ein ähnliches Verhalten ist für die Deblockierung der aktiven Tasche der Hck-Kinase durch Tyrosin-Phosphorylierung beschrieben (vgl. Seite 89 unten).

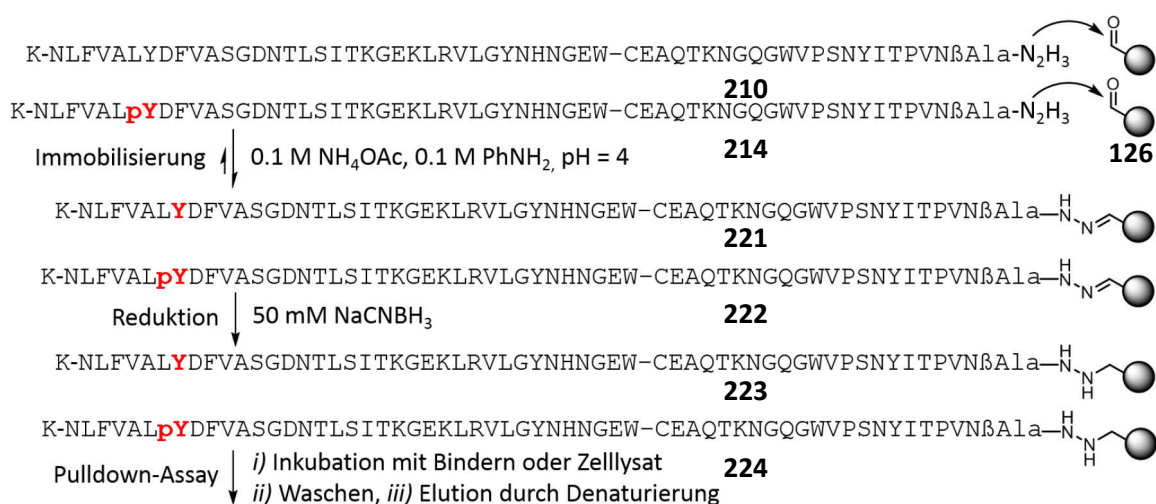
4.8 Pulldown-Experimente zur Evaluierung der Abl-SH3 Phosphoregulierung

Im Kontext der in den Unterkapiteln 4.5 - 4.7 erhaltenen Daten erscheint es interessant, ob im *in-vitro* Zellexperiment ebenso eine differenzierte Ligandenerkennung stattfindet. Dafür sollten Pulldown-Experimente mit unterschiedlich phosphorylierten Abl-SH3-Domänen durchgeführt werden. Ziel war es, im Zelllysate leukämischer Zellen spezifische Interaktionspartner für die auf Agarose-Kugeln immobilisierte unphosphorylierte oder Y⁷-phosphorylierte SH3-Domäne zu finden.

4.8.1 Immobilisierung und Bindungsfähigkeit von (Phospho)SH3-Domänen auf Agarose-Kugeln

Bevor das Pulldown-Experiment durchgeführt werden konnte, musste die Y⁷Y³⁰Y⁵²-SH3-Domäne und die pY⁷-SH3-Domäne von Abl auf Agarose-Kugeln immobilisiert werden. Diese Phosphoform wurde gewählt, da sie als entscheidend für die Tumorphoresion besonders in CML beschrieben wurde (in Abschnitt 2.6, Seite 36). Weiterhin sollte überprüft werden, ob die SH3-Domänen auf diesen Sphären unter Pulldown-Bedingungen prolinreiche Peptide binden können.

Zunächst wurden die Domänen **210** und **214** entsprechend der Abbildung 4.21 und Schema 4.12 auf Seite 95 und 96 wiederholt synthetisiert. Aldehyd-funktionalisierte Agarose-Sphären **126** konnten nach der Reaktionsgleichung in Schema 4.6 A auf Seite 61 erhalten werden. Die unphosphorylierte Domäne **210** und die Y⁷-phosphorylierte Abl-SH3-Domäne **214** wurde mittels Anilin-katalysierter Hydrazon-Ligation innerhalb von zwei Stunden vollständig immobilisiert (Schema 4.13).



Schema 4.13: Immobilisierung der Y⁷Y³⁰Y⁵² **210** und pY⁷ **214** SH3-Domäne auf Aldehyd-funktionalisierten Agarose-Kugeln **126**, mit folgender Reduktion der Hydrazonbindung. Anschließend kann die Bindungsfähigkeit getestet werden.

Um die Stabilität der (Phospho)SH3-Domänen-Hydrazone **221** und **222** insbesondere für die folgenden Waschschritte zu erhöhen, wurden die beladenen Kugeln mit einer 50 mM NaCNBH₃ Lösung im PBS-Puffer behandelt (Bildung der *N*-Alkylhydrazide **223** und **224**).

Im Folgenden wurden die kovalent immobilisierten Domänen für eine Reihe von Pulldown-Experimenten verwendet werden. Dabei wurden folgende Schritte ausgeführt: (1.) Die Inkubation mit Bindern in PBS-Puffer; (2.) Das Waschen mit PBS-Puffer; (3.) Die Elution der Binder durch Denaturierung der SH3-Domänen (4.) Die Analyse der Binder.

Als erstes wurde die Bindungsfähigkeit mit Hilfe der Fluorimetrie getestet. Dazu wurden die Domänen-beladenen Agarose-Kugeln **223** (Y⁷Y³⁰Y⁵²) und **224** (pY⁷) 30 min lang mit einer Lösung des FAM-markierten 3BP2 Peptid **204** (100 µM) inkubiert. Anschließend wurde mehrfach mit PBS-Puffer gewaschen und jeweils die Fluoreszenz des Überstandes bestimmt (Abbildung 4.27). Daraufhin wurden die Kugeln mit dem SDS-Puffer (125 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris), 20 vol.% Glycerin, 5 vol.% β-Mercaptoethanol, 4 ma.% Natriumdodecylsulfat (SDS), pH 6.8) bei 85°C behandelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.27 zu sehen. Im ersten Waschschritt mit 5 ml PBS war noch eine deutliche Menge an FAM-3BP2 Peptid **204** vorhanden, da die Waschlösung eine Fluoreszenz von über 6'000 a.u. zeigte. Nach viermaligem Waschen war keine nennenswerte Fluoreszenz mehr zu beobachten. Die folgende Behandlung der Agarose-Kugeln mit 1 ml SDS-Puffer bei 85°C für 10 min zeigte im Überstand eine deutliche Erhöhung des Fluoreszenzsignals auf 1'757 a.u. und bei der unphosphorylierten Domäne auf 1'407 a.u. Dies lässt vermuten, dass die immobilisierten Domänen bindungsfähig sind. Darüber hinaus hatten beide SH3-Domänen ungefähr die gleiche Menge Peptid **204** gebunden.

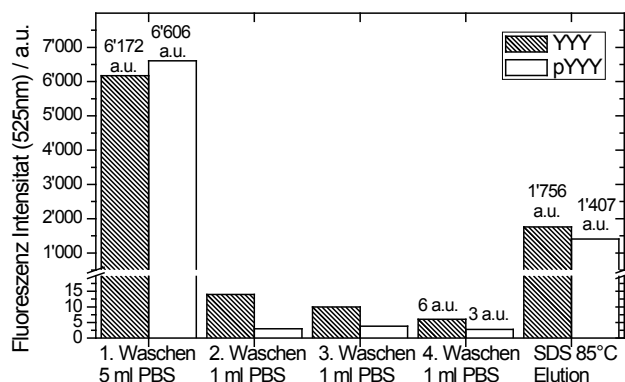


Abbildung 4.27: Absolute Fluoreszenz-Intensitäten nach dem Waschen des Agaroseträgers im PBS-Waschpuffer. Vorher wurden die auf Agarose-Kugeln immobilisierten SH3-Domänen Y⁷Y³⁰Y⁵² **223** und pY⁷ **224** mit dem 3BP2 Peptids **204** inkubiert (30 min).

Da der erhöhte Fluoreszenzwert auch auf eine unspezifische Bindung des FAM-markierten 3BP2-Peptids **204** zurückzuführen sein könnte, wurde ein Experiment durchgeführt bei dem die UPLC-MS als Analysemethode gewählt wurde. Außerdem wurde als Elutionspuffer eine 8 M Harnstofflösung verwendet. Dabei wurden zwei Peptide untersucht: Das FAM-markierte p41-Peptid **205** sowie erneut das 3BP2-Peptid **204**. Nach erfolgreicher Bindung sollte die Behandlung mit Harnstoff zur Denaturierung der SH3-Domänen und somit zur Elution der FAM-markierten Peptide führen. Die Agarose-Kugeln, auf denen die Domäne $Y^7Y^{30}Y^{52}$ **223** und pY^7 **224** immobilisiert waren, wurden jeweils 30 min mit einer 100 μ M Lösung des p41-Peptids **205** und des 3BP2-Peptids **204** im PBS-Puffer inkubiert (Abbildung 4.28).

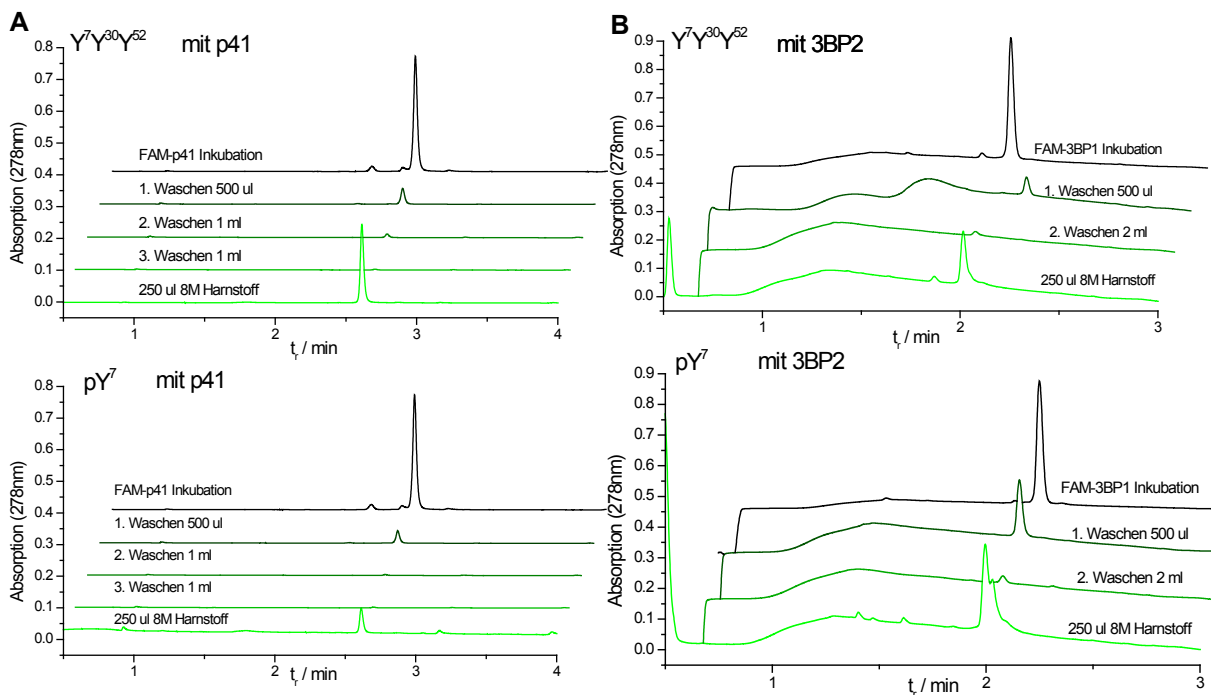


Abbildung 4.28: UPLC-MS Chromatogramm während der Inkubation mit dem p41 Peptid **205** und dem 3BP2 Peptid **204** und nach dem Waschen der Domänen-Agarosekugel $Y^7Y^{30}Y^{52}$ **223** und pY^7 **224** sowie anschließende Elution mit 8 M Harnstofflösung.

Nachdem der Überstand entfernt wurde, zeigte eine Analyse der PBS-Waschlösung, dass noch FAM-Peptid im Träger vorhanden war. Vernachlässigbar geringe Mengen Peptid waren im Überstand der zweiten Waschlösung zu beobachten. Eine anschließende Behandlung der funktionalisierten Agarose-Sphären mit 8 M Harnstofflösung für 10 min ließ wieder Peptid **205** und **204** erkennen. Im Vergleich der eluierten Peptidmengen viel auf, dass bei drei von vier Elutionen eine ähnliche Stoffmenge ($\sim 25\%$ der eingesetzten Menge) erhalten wurde. Das Experiment mit dem Peptid p41 **205** zeigte einen Unterschied an Stoffmenge im Elutionspuffer. Von der unphosphorylierten SH3-Domäne

mäne wurde etwa 25% der eingesetzten Menge des Peptids **205** eluiert. Bei der phosphorylierten SH3-Domäne waren es lediglich 10% (Abbildung 4.28 A). Dies kann an Hand der K_D -Werte erklärt werden ($p41\text{-Y}^7\text{Y}^{30}\text{Y}^{52}\text{-K}_D = 1.6 \mu\text{M}$ ggü. $p41\text{-pY}^7\text{-K}_D = 12 \mu\text{M}$). Anders verhält es sich bei der Bindung von 3BP2 **204** (Abbildung 4.28 B). Bei diesem Experiment wurden die gleichen Mengen an Peptid **204** von der unphosphorylierten und phosphorylierten SH3-Domäne gebunden. Auch dieser Sachverhalt ist bei Betrachtung der ermittelten K_D -Werte zu erwarten ($3BP2\text{-Y}^7\text{Y}^{30}\text{Y}^{52}\text{-K}_D = 4.4 \mu\text{M}$ ggü. $3BP2\text{-pY}^7\text{-K}_D = 5 \mu\text{M}$). Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit dem ersten Experiment zur Bindungsfähigkeit ermittelt durch die Fluoreszenzintensität des Eluats.

Die dargestellten Experimente mit Fluoreszenz- und UPLC-MS-Analyse haben gezeigt, dass eine funktionelle Erkennung potentieller Liganden durch immobilisierte SH3-Domänen auf Agarose-Kugeln möglich ist. Außerdem war auch hier eine differenzierte Liganden-Erkennung in Abhängigkeit der Phosphorylierung zu erkennen.

4.8.2 Pulldown-Experiment mit K562-Zelllysate

Es sollte mit Hilfe eines Pulldown-Experiments getestet werden, ob die Phosphorylierung in einem komplexen biologischen System in gleicher Weise das SH3-Domänen-Erkennungsreportoir verändert. Als biologisches System wurde das Zelllysate von K562-Zellen gewählt. Diese Zelllinie entstammt einer CML-Patientin, ist positiv für das Philadelphia-Chromosom und zeigt proteomische Charakteristiken undifferenzierter Granulozyten und Erythrozyten.^[252] Die Vorgehensweise des Pulldown-Experiments ist in Abbildung 4.29 A dargestellt und orientiert sich an einem Protokoll des Arbeitskreises *Dr. Eberhardt Krause* (FMP Berlin). Die auf Agarose-Kugeln immobilisierten SH3-Domänen sollten dementsprechend parallel in Duplikaten mit K562-Zelllysate inkubiert werden. Anschließend wird gewaschen und die gebundenen Proteine und Peptide werden durch Denaturierung der SH3-Domänen von den Sphären eluiert. Dieses Eluat wird mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) in mehrere Fraktionen aufgetrennt. Die Proteine innerhalb der Fraktionen werden im Gel durch Trypsin gespalten und anschließend mit einer LC-ESI-MS/MS-Methode analysiert. Der direkte Vergleich von Proteinen die ursprünglich entweder von der unphosphorylierten oder der phosphorylierten SH3-Domäne gebunden wurden, ermöglicht es das Erkennungsrepertoires in einer Proteom-weiten Größenordnung abzuschätzen.

Erste Versuche, die K562-Zellen in einem im Arbeitskreis *Krause* etablierten Zelllyse-Puffer aufzuschließen, schlugen fehl. Unter Zuhilfenahme dieses HEPES-Zellauf-

schlusspuffers zeigte sich unter dem Mikroskop ein unvollständiger Aufschluss der Zellen. Darüber hinaus konnte mit 20 Millionen K562-Zellen in 350 µl lediglich eine Proteinkonzentration von 1.7 mg/ml erreicht werden (2 mg/ml war erwünscht). Es wurde daher ein optimierter Aufschluss-Puffer verwendet, der als wichtigste Inhaltsstoffe Tris, PEG-40-Nonylphenolether (NP-40) sowie Phosphatase-Inhibitoren beinhaltete. Alle Inhaltsstoffe und Konzentrationen sind im Abschnitt 6.2, Seite 142 aufgeführt. Mit diesem Puffer wurden 2 Millionen Zellen in 350 µl aufgeschlossen und eine Proteinkonzentration von 1.9 mg/ml erhalten. Darüber hinaus konnten durch das Mikroskop keine intakten Zellen beobachtet werden. Die beiden immobilisierten SH3-Domänen Y⁷Y³⁰Y⁵² **223** und pY⁷ **224** wurden in je zwei Spritzenreaktoren (Duplikate) mit dem erhaltenen K562-Zelllysats inkubiert (18 h bei 4°C). Nach dem Waschen, wurden die immobilisierten Domänen mit SDS-Probenpuffer bei 95°C (10 min) denaturiert. Die somit eluierten Binder wurden anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Es wurde je eine Gel-Tasche mit dem gesamten erhaltenen Eluat aller vier Duplikate gefüllt. Die so erhaltenen vier Banden wurden mit Hilfe einer Rasierklinge gleichmäßig in je 15 Fraktionen geteilt. Das Gel wurde weiter zerkleinert und in Probengefäße gefüllt. Anschließende Zugabe von Trypsin sollte die Proteine in kleinere Fragmente teilen. In der Folge wurden alle 60 Proben mittels nano LC-ESI-MS/MS Messung analysiert.

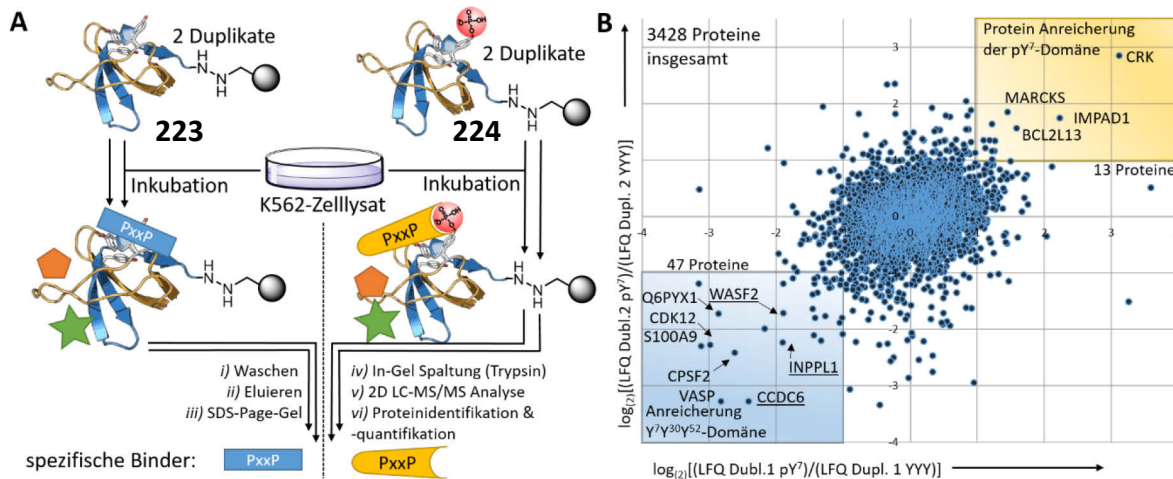


Abbildung 4.29 A: Vorgehensweise der verwendeten Pulldown-Methode. **B:** Ergebnisse der LFQ-Intensitäts-Analyse: Die durch ihre LFQ-Werte identifizierten Proteine (im gelben Kasten die durch die pY⁷ Domäne und im blauen Kasten die durch Y⁷Y³⁰Y⁵² Domäne angereicherten Proteine). Dupl. = Duplikat.

Die Software *MaxQuant*^[253] ermittelte aus den erhaltenen Massenspektren 147'854 Sequenzen. Ein Abgleich der gefundenen Sequenzen mit der humanen UniProt-Datenbank identifizierte insgesamt 3428 Proteine. Für eine eindeutige Protein-Zuordnung mussten mindestens zwei *razor*- oder eine *unique*-Peptid der Proteinsequenz entsprechen. *Razor*-Peptide sind Peptide von denen Sequenzhomologe in mehr als zwei Proteinen bekannt

sind. *Unique*-Peptide sind einzigartige Sequenzen für ein bestimmtes Protein. Häufig wurden dieselben Proteine in den vier Eluaten beider SH3-Domänen gefunden (unphosphoryliert und phosphoryliert). Um eine unterschiedlich starke Anreicherung zu identifizieren ist daher eine Quantifizierung der Menge eines bestimmten Proteins notwendig. Es wurde die sogenannte *label-free quantification* (LFQ) verwendet. Diese erlaubt einen isotoopenmarkierungsfreien Vergleich des Proteingehalts mehrerer Proben. Bei der Methode wird davon ausgegangen, dass der größte Protein-Anteil innerhalb einer Eluat-Fraktion unspezifisch gebunden war und daher die zu vergleichenden Proben in etwa die gleiche totale Proteinintensität haben sollten. Die gesamte Proteinintensität wird in den Proben auf den gleichen Wert normiert und anschließend werden die Intensitäten der einzelnen Proteine anhand des Normfaktors ermittelt. Die so erhaltenen LFQ-Intensitäten sind demnach innerhalb der normierten Messungen vergleichbar. Die LFQ-Intensitäten der 3'428 gefundenen Proteine sind in Abbildung 4.29 B für beide duplizierten Experimente logarithmisch (Log_2) aufgetragen. Positive Werte stehen dabei für eine Anreicherung durch die phosphorylierte SH3-Domäne (pY⁷) **224**, negative für eine vermehrte Erkennung durch die unphosphorylierte Domäne **223**. In beiden Duplikaten der phosphorylierten oder unphosphorylierten SH3-Domäne gleichermaßen angereicherte Proteine sind auf der 1. Winkelhalbierenden des Koordinatensystems zu finden. Proteine, die mindestens die doppelte Signalintensität ($\text{Log}_2(\text{LFQ}) > 1$) gegenüber der jeweils anderen Domäne in beiden Duplikaten zeigten, wurden als spezifisch gebunden klassifiziert. Die durch die pY⁷-SH3-Domäne verstärkt gebundenen Proteine sind in dem gelben, die durch die Y⁷Y³⁰Y⁵²-SH3-Domäne angereicherten Sequenzen in dem blauen Kasten in Abbildung 4.29 B markiert. Es konnten der phosphorylierten Domäne 13 Proteine und der unphosphorylierten SH3-Domäne 47 Sequenzen zugeordnet werden.

Methodisch bedingt kann nicht immer eine LFQ-Intensität erhalten werden, wenn in einer Vergleichsprobe die Intensität sehr niedrig war. Eine fehlende oder sehr geringen LFQ-Intensität kann auf eine Nichtanwesenheit des Proteins in der Fraktion hindeuten. Im Vergleich mit einer anderen Probe könnte dies bedeuten, dass es sich bei diesem Protein um eine sehr spezifische Bindung oder um ein Artefakt handeln. Daher wurde eine zweite Methode zur spezifischen Proteinidentifizierung verwendet. Diese nutzt die Anzahl an *razor*- und *unique*-Peptiden. Als spezifisch-erkannt wurden Proteine klassifiziert, wenn die folgenden drei Bedingungen erfüllt waren: (1.) In beiden Duplikaten der pY⁷- oder Y⁷Y³⁰Y⁵²-Eluate muss die Summe an *razor*- und *unique*-Peptiden mindestens 2 sein. (2.) Das Verhältnis der Anzahl der *razor*- und *unique*-Peptide zur

Vergleichsprobe muss größer gleich zwei sein. Eine Peptidanzahl von Null wurden durch 0.01 ersetzt, um ein Verhältnis berechnen zu können. (3.) Die nicht-normierten Proteinintensitäten mussten im Verhältnis größer oder gleich zwei sein. Somit wurden durch die pY⁷-SH3-Domäne **224** 65 Proteine spezifisch gebunden und durch die Y⁷Y³⁰Y⁵²-Domäne **223** 22 (Abbildung 4.30 A). Eine Liste aller erkannten Proteine ist im Anhang in Tabelle A 1 und A 2 auf Seite 246ff zu finden. Insgesamt wurden somit 78 Proteine (13 LFQ und 65 Peptidanzahl) durch die pY⁷-SH3-Domäne und 67 Proteine (47 LFQ und 22 Peptidanzahl, zwei Proteine durch beide Methoden erkannt) durch die Y⁷Y³⁰Y⁵²-SH3-Domäne angereichert.

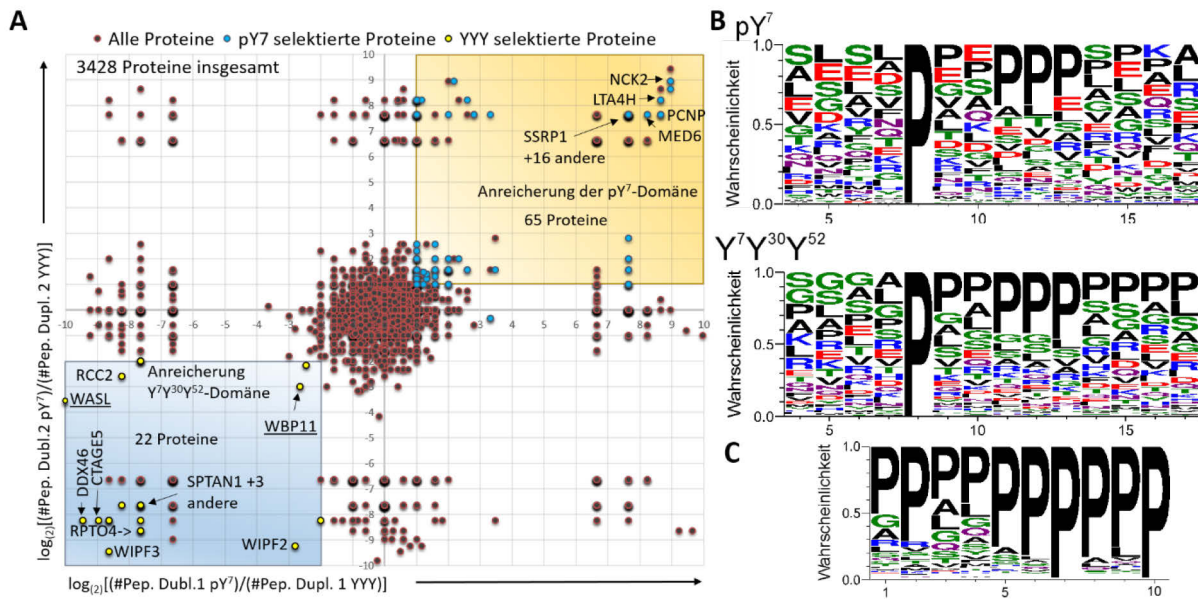


Abbildung 4.30 A: Die an Hand der *razor*- und *unique*-Peptide identifizierte Proteine, die spezifisch an eine SH3-Domäne gebunden haben. Blaue Punkte im gelben Kasten sind Proteine, die durch die pY⁷-Domäne und gelbe Punkte im blauen Kasten sind Proteine, die durch die Y⁷Y³⁰Y⁵²-Domäne angereichert wurden. #Pep. = Anzahl an *razor* und *unique*-Peptiden, Dupl. = Duplikat. **B:** Weblogo-Darstellung der in den spezifisch erkannten Proteinen gefundenen Aminosäuren, angereichert durch die Y⁷Y³⁰Y⁵²-Domäne (oben) und durch die pY⁷-Domäne (unten). **C:** Weblogo-Darstellung der 237 Sequenzen, die durch Peptid-Mikroarrays als Binder der unphosphorylierten Abl-SH3-Domäne identifiziert wurden.

Bei der pY⁷-Anreicherung wurden fünf Proteine erkannt, die eine SH2-Domäne besitzen. So wurde zum Beispiel das CRK-Protein mit einer achtfach erhöhten Signalintensität in den Proben des pY⁷-Pulldowns im Vergleich zu den Proben der unphosphorylierten Domäne gefunden (in Abbildung 4.29 B im gelben Kasten). CRK könnte über die SH2-Domäne die pYDFV Sequenz binden (pYDSL, pYDDV, pYDGI und pYDDI sind als Bindungspartner bekannt).^[254] Andererseits ist für CRK außerdem bekannt, dass prolinreiche Sequenzen durch die Abl-SH3-Domäne erkannt werden.^[255] Nach *Donaldson et al.* wird CRK durch die Abl-Kinase phosphoryliert und erkennt die eigene pY-Sequenz *in cis*. Die SH2-Domäne steht demnach nicht mehr zur Bindung zur Verfügung.

Es wird weiterhin eine Bindung der Abl-SH3-Domäne zu CRK beschrieben. Somit ist zu vermuten, dass in den CML-Zellen die eine erhöhte Abl- und Bcr-Abl-Kinaseaktivität besitzen, CRK in der geschlossenen Konformation vorlag und von der Abl-pY⁷-SH3-Domäne über Pro-Cluster gebunden wurde. PTB, IRS, oder PTBI-Domänen, die ebenfalls pTyr haltige Peptide binden können, wurden nicht in der durch die pY⁷-Domäne angereicherten Proteingruppe gefunden. Die durch beide SH3-Domänen erkannten Proteine besaßen häufig prolinreiche Sequenzen. Potentielle Erkennungsmotive sind in Tabelle 4.13 gegeben.

Tabelle 4.13: Zufällig ausgewählte Proteine, die beiden Duplikaten der Eluate der pY⁷- oder der Y⁷Y³⁰Y⁵²-SH3-Domäne identifiziert wurden sowie ihre prolinreichen Sequenzmotive. Die Proteine sind in Abbildung 4.29 B und Abbildung 4.30 A markiert.

	LFQ-identifizierte Proteine ^[a]	Peptidanzahl-identifizierte Proteine ^[a]
pY ⁷ - SH3- Domäne	MARCKS (PGAPP, PEAPP), CRK (SH2-Domäne, PRPPVPPSPAQPPP u.a.), PXXP), LTA4H (PPSFP, PDPEDP), PCNP (PE-BCL2L13 (PPESP, PEAPAPLLP, PVPP), EMPF, PTKP), MED6 (PIPETVKP, kein PXXP), IMPAD (PKEVP, kein PXXP)	NCK2 (SH2-Domäne, PAHAP, PENDP, kein PXXP), LTA4H (PPSFP, PDPEDP), PCNP (PE-BCL2L13 (PPESP, PEAPAPLLP, PVPP), EMPF, PTKP), MED6 (PIPETVKP, kein PXXP), SSRP1 (PNAPKRP)
Y ⁷ Y ³⁰ Y ⁵² - SH3- Domäne	VASP (PGLPPSGVP, 2x PXXXX u.a.), WIPF2 (PGPPPP, 3x PXXXX, PPAPPPVKPP, CPSF2 (PMFPAP, PLPPHEVP), Q6PYX1 ^[b] PPLPP, u.a.), WIPF3 (5x PXXXX, PPT-PPCPAP, FPPKP), CDK12 (PPPPLP, PPPLPPA u.a.), SPTAN1 (kein PXXP-Motiv, PPEKRPPEPPGP ₇ , PPLPLPPLLP u.a.), PMVEEGEPDPE), RCC2 (PEYNPR), DDX46 A100A9 (kein PXXP), KHDRBS1 (PPPPPP, (PPGKEPK, kein PXXP), CTAGE5 (PPPLAP, PPPLLP, PAPTLLLP u.a.)	WIPF2 (PGPPPP, 3x PXXXX, PPAPPPVKPP, CPSF2 (PMFPAP, PLPPHEVP), Q6PYX1 ^[b] PPLPP, u.a.), WIPF3 (5x PXXXX, PPT-PPCPAP, FPPKP), CDK12 (PPPPLP, PPPLPPA u.a.), SPTAN1 (kein PXXP-Motiv, PPEKRPPEPPGP ₇ , PPLPLPPLLP u.a.), PMVEEGEPDPE), RCC2 (PEYNPR), DDX46 A100A9 (kein PXXP), KHDRBS1 (PPPPPP, (PPGKEPK, kein PXXP), CTAGE5 (PPPLAP, PPPLLP, PAPTLLLP u.a.)

[a] Genamen der Proteine. [b] UniProt-ID da kein Genname vorhanden.

Eine ausführliche Auflistung mit der prolinreichen Sequenzen aller spezifisch erkannten Proteine findet sich in Tabelle A 3 und 4 ab Seite 249. Von insgesamt 78 Proteinen die durch die pY⁷-SH3-Domäne angereichert wurden, waren in 67 Proteine 186 Sequenzen mit PXXP-, PXXXXP- oder PXXXXP-Motiv (PX₍₂₋₄₎P) zu finden. Innerhalb der 67 Proteinen der Y⁷Y³⁰Y⁵²-SH3-Domänen-Proteingruppe, konnten 59 Proteine mit 370 Sequenzen gefunden werden, die ein PX₍₂₋₄₎P-Motiv besaßen.

Mit Hilfe der Peptid-Array-Technologie wurden 237 prolinreiche Peptide als Binder für die Abl-SH3-Domänen identifiziert.^[256] Die 237 Peptide entstammten 158 humanen Proteinen. Fünf dieser humanen Proteine wurde ebenfalls reproduziert im Y⁷Y³⁰Y⁵²-SH3-Domänen-Pulldown gefunden. Ein Überblick ist in Tabelle 4.14 gegeben. Die Proteine sind außerdem in Abbildung 4.29 B und Abbildung 4.30 A unterstrichen. Durch die pY⁷ SH3-Domäne wurde keines der 158 Proteine angereichert.

Tabelle 4.14: Durch die unphosphorylierte SH3-Domäne angereicherten Proteine, die ebenfalls mit Hilfe der Peptid-Mikroarray-Technologie durch *Xu et al.* als Binder für die Abl-SH3-Domäne bestätigt wurden. Die angegebenen Peptidsequenzen sind bestätigte Binder für die unphosphorylierte Abl-SH3-Domäne.^[256]

#	Genname	UniProt-ID	bekannte prolinreiche Binder für Abl-SH3 ^[256]
5	CCDC6	A0A024QZJ7	PVQPPPPPPP
44	WASF2	Q9Y6W5	PPPPPPPGPP
16	INPPL1	O15357	PPDFPPPLP
48	ABI1	B6VEX5	SPTPPPPPPP
66	WASL	O00401	PVAPPPPPPP, APSGPPPPPP, VAPPPPPPPP, GPVAPPPPPP, SRGGPPPPPP
67	WBP11	B4DMD3	PPLGPPPAPP

Um die Sequenzvorlieben der beiden Abl-SH3-Domänen zu untersuchen, wurden die Sequenzen der angereicherten Proteine mit Hilfe der *Prosita*-Suchmaschine^[257] nach $Px_{(2-4)}P$ -Motiven durchsucht (Bei der pY^7 -Proteingruppe wurden die Proteine mit SH2-Domänen nicht berücksichtigt). Es wurden ebenfalls die acht Aminosäuren vor und acht nach dem Motiv herausgesucht. Die erhaltenen nichtredundanten prolinreichen Sequenzen (20 Aminosäuren lang) wurden mit Hilfe der *Weblogo*-Internetseite analysiert, um die Aminosäurezusammensetzung zu visualisieren.^[258] Das Ergebnis ist in Abbildung 4.30 B. zu sehen. Die Aminosäurehäufigkeiten innerhalb der prolinreichen Sequenzen sind an Hand der Größe der entsprechenden Buchstaben (Einbuchstabencode) dargestellt. Die häufigsten Aminosäuren sind dabei am größten und am weitesten oben dargestellt. Die $Y^7Y^{30}Y^{52}$ -SH3-Domäne **223** hat sehr prolinreiche Sequenzen erkannt. 15 von 20 Sequenzpositionen sind mit Prolin besetzt, danach folgt Glycin (auf Position 5-6 am häufigsten), Alanin (am häufigsten auf Position 7) sowie Serin (am häufigsten auf Position 4) und Leucin ist ebenfalls wahrscheinlich. Die Aminosäure-Wahrscheinlichkeiten der oben erwähnten 237 bekannten Binder von Abl-SH3 wurden ebenfalls als Weblogo dargestellt (Abbildung 4.30 C).^[256] Die Analyse zeigt ähnliche Aminosäure-Häufigkeiten, wie die durch das Pulldown-Experiment gefunden. Diese Binder zeigen eine noch größere Wahrscheinlichkeit von Prolin. Interessanterweise weisen 8 von 10 der bekannten Binder, der ebenfalls im $Y^7Y^{30}Y^{52}$ -SH3-Domänen-Pulldown erkannten Proteine die Sequenz PPPPP auf. In der $Y^7Y^{30}Y^{52}$ -Proteingruppe war diese Sequenz ebenfalls häufig vertreten (8.38%, 31-mal innerhalb 370 Sequenzen). Zum Vergleich war dieses Motiv in der pY^7 -Proteingruppe nur einmal vertreten (0.53% von 186 Sequenzen).

Die pY^7 -SH3-Domäne **224** reicherte ebenfalls prolinreiche Sequenzen an. Im Allgemeinen waren die erkannten Sequenzen aber polarer als bei der Anreicherung durch die unphosphorylierte Domäne. Serin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Lysin aber auch

Leucin waren wahrscheinlich. Serin ist an Position 4, 6, und 14 die häufigste Aminosäure (10-15%). Die basischen Aminosäuren Lysin und Arginin sind vor allem auf Position 14-17 mit einer Wahrscheinlichkeit von 10-15% zu finden. Auf Position 16 ist Lysin die häufigste Aminosäure. In diesem Bereich wäre –bei Bindung nach Klasse I– eine ionische Interaktion mit der Phosphatgruppe denkbar. Prolinreiche Binder, die durch die phosphorylierte SH3-Domäne erkannt wurden, können möglicherweise mit dem Phosphat des pTyr Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden. Die erhöhten Häufigkeiten für die Ser, Asp und Glu-Reste sind Indizien für diese These. Auf Position 4 bis 10, mit Ausnahme von 8, sind diese Aminosäuren mit hoher Wahrscheinlichkeit vertreten (10-25%). Eine weitere Affinitätssteigerung kann durch Lys oder Arg generiert werden. Die Bindungstasche der Lck-SH2-Domäne weißt genau diese Aminosäuren (Ser, Glu, Arg) auf und zeigt bei der Bindung zu einem pTyr-Peptid in der Kristallstruktur, dass vor allem Ser und Glu sich nah an der Phosphatgruppe befinden und mit dieser Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden.^[259]

4.8.3 Diskussion und Fazit

Eine eindeutige Erklärung der Bindungsdifferenzierung ist schwierig. Schon für unphosphorylierte SH3-Domänen ist bis heute die Bindung von prolinreichen Sequenzen nicht komplett verstanden. Die Bindung von PPII-Helices scheint essentiell zu sein. Die Notwendigkeit für ein PXXP-Motiv ist dagegen umstritten.^[202] Viele SH3-Domänen binden Liganden –teilweise mit hoher Affinität–, welche kein PXXP-Motiv aufweisen.^[202] Es wird vermutet, dass durch die Fokussierung auf PXXP-Motive SH3-Domänen-Binder, die dieses Motiv nicht besitzen, der Aufmerksamkeit entgangen sind. So sind für mehr als die Hälfte der rund 300 SH3-Domänen keine Binder bekannt.^[260] Im dargestellten Pulldown-Experiment besaßen acht Proteine der Y⁷Y³⁰Y⁵²-Anreicherung und elf Proteine der pY⁷-Gruppe kein PX₍₂₋₄₎P-Motiv. Es könnte sich um falsch-positive Treffer oder um nicht-klassische Binder handeln.

Im Allgemeinen wurden SH3-Domänen vermutlich durch die Evolution nicht zu hohen Affinitäten optimiert, sondern eher dazu viele Peptide mit geringer Affinität flexibel zu binden. Spezifität wird teilweise durch hohe lokale Konzentration (z.B. an der Zellmembran oder durch Bindung *in cis*) sowie auch durch Multivalenz erreicht. Die moderaten Affinitäten sind häufig von Vorteil, da eine schnelle Ablösung des Binders möglich ist. Somit ist verständlich wieso ein flexibles Bindungsmotiv vorteilhaft ist. In bestimmten Fällen ist eine spezifische Erkennung allerdings nützlich. Eine Ver-

änderung des Erkennungsrepertoires kann dadurch neue Signalwege öffnen. Die bisherigen Ergebnisse legen nahe, dass die unphosphorylierte Abl-SH3-Domäne sehr prolinreiche eher unpolare Proline-Cluster erkennt. Durch Phosphorylierung an Y⁷ wird die Affinität für etwas Prolin-ärmere und polarere Sequenzen erhöht. Im Hinblick auf eine mögliche Veränderung von Signalwegen während der Tumorprogression sind die Ergebnisse des Pulldowns ebenso interessant. So wurde zum Beispiel das BCL2L13-Protein selektiv durch die pY⁷-Domäne gebunden. Dieses eigentlich pro-apoptotische Protein kommt in hohen Konzentrationen in Krebs-Zellen vor, besonders in akuter lymphatischer Leukämie (ALL)^[261] oder in Glioblastom^[262] (bösartiger Hirntumor). Eine hohe Konzentration sorgt dort für eine längere Lebensdauer der Krebszellen.^[261] Die RNA-Expression für dieses Protein ist in K562-Zellen laut *Human-Protein-Atlas* am höchsten innerhalb aller 44-gelisteten humanen Zelllinien.^[263] Das BCL2L13-Protein wird nach den hier gezeigten Ergebnissen selektiver durch die Y⁷-phosphorylierte Abl-SH3-Domäne gebunden, die Klärung der biologischen Bedeutung dieser Erkennung bedarf allerdings weiterer Erforschung.

Die Y⁷-Phosphorylierung wurde als entscheidend in der Tumorprogression beschrieben (in Abschnitt 2.6, Seite 36). Die durch das veränderte Erkennungsrepertoires der pY⁷-Abl-SH3-Domäne erkannten Proteine könnten Bindungspartner für veränderte Signalwege sein, die Tumorprogression auslösen. Beispielsweise ist bekannt, dass die Abl- und Arg-Kinasen in einer Signalkaskade, die durch oxidativen Stress ausgelöst wird, zusammen mit CRK für einen Verlust der Zellpolarität in Epithelzellen sorgen.^[264] Diese Veränderung der Zellpolarität und -struktur ist ein frühes Ereignis in der Evolution von Epithel-Tumoren.^[265]

5. Kapitel: Zusammenfassung und Ausblick

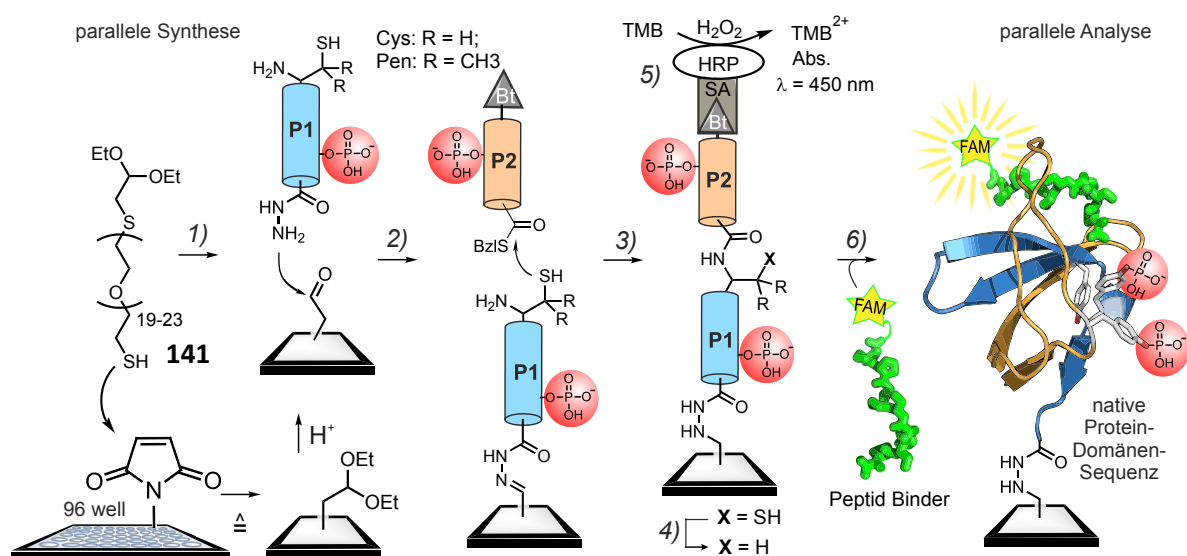
5.1 Zusammenfassung

Protein-Arrays sind sehr nützliche Werkzeuge um Protein-Protein-Interaktionsnetzwerke zu erforschen.^[139,266] Protein-Protein-Wechselwirkungen steuern Signaltransduktionskaskaden, die maßgeblich durch posttranslationale-Modifizierungen (PTMs) beeinflusst werden.^[267] Üblicherweise werden Protein-Arrays durch ortsspezifische Deponierung rekombinanter Proteine hergestellt. Allerdings sind biologische Methoden nicht in der Lage, PTMs generisch mit Ortsspezifität zu installieren. Chemische Methoden bieten theoretisch unbeschränkten Zugang zu beliebigen Modifizierungen. Dennoch gab es vor dieser Arbeit keinen Bericht über die chemische Synthese von posttranslational-modifizierten Proteinen oder Protein-Domänen im Parallelformat auf Array-Oberflächen.

Die chemische Herstellung der gewünschten Arrays sieht sich vielen Hürden gegenüber. Eine lineare Synthese der Proteine oder der Protein-Domänen auf der Array-Oberfläche oder vor der Immobilisierung ist auf Grund der großen Länge und der komplexen Faltung nicht möglich. Daher müssen Fragmentverknüpfungsreaktionen verwendet werden. Die nützlichste Methode ist die native chemische Ligation (NCL). Diese benötigt Cystein an der Verknüpfungstellen. Bei Proteinsequenzen die kein Cystein besitzen (wie z.B. die SH3-Domäne der Arg Tyrosinkinase) wird eine Entschwefelungsstrategie benötigt bei der Cystein oder andere Thiol-modifizierte Aminosäuren nach der Ligation zu proteinogenen Aminosäureresten umgewandelt werden (z.B. Penicillamin zu Val). Es können auch Ligationsauxiliare verwendet werden. Beide Klassen liefern die native Sequenz nach chemischer Behandlung. Die Proteinimmobilisierung und die PTMs muss diesen Bedingungen standhalten. Darüber hinaus sollte die Protein-Fragmentsynthese im Parallelformat durchführbar sein, um einen hohen Durchsatz zu garantieren. In dieser Arbeit ist es gelungen, eine Methodik zu finden, die es ermöglicht (Phospho)Protein-Domänen-Arrays ohne HPLC-Reinigung im Parallelformat herzustellen und für Bindungsmessungen zu verwenden. Es wurde zuerst festgesellt, dass eine Immobilisierung mit Hilfe der Ni-His₆-Technik zu labil für die benötigte Oberflächenchemie ist (Abschnitt 4.1). Die Immobilisierung durch Kupfer-katalysierte Alkin-Azid-Cycloaddition lieferte zwar eine stabile Verankerung, zeigte aber eine geringe Reproduzierbarkeit bei der Oberflächenverknüpfung (Abschnitt 4.2). Als geeignet erwies sich

die Hydrazonligation, durch die Peptidhydrazide verlässlich immobilisiert werden konnten (Abschnitt 4.3).

Die (Phospho)Protein-Domänen-Array-Synthese und Analyse im Parallelformat (Schema 5.1) gelang durch: (1.) die Generierung von Aldehyd-Funktionen mittels Michael-Addition des Mercapto-polyethylenglycol-acetal Linkers **141**, (2.) Immobilisierung von *N*-Thio-Peptidhydraziden via Hydrazonligation, (3.) NCL auf der Oberfläche mit biotinylierten selbstgereinigten Peptidthioestern, (4.) radikalisch induzierte Entschwefelung, (5.) Ausbeutebestimmung und (6.) oberflächenbasierter Fluoreszenzbindungs-Assay zur funktionellen Charakterisierung.



Schema 5.1: Allgemeines Vorgehen bei der parallelen Synthese und Analyse von (Phospho)Protein-Domänen Arrays: 1.) Funktionalisierung durch Addition des Mercapto-polyethylenglycol-acetal Linkers **141**, mit anschließender sauren Öffnung des Acetals zum Aldehyd. 2.) Immobilisierung von *N*-Thio-Peptidhydraziden durch Hydrazonligation. 3.) NCL mit biotinylierten Peptidthioester die selbstgereinigt erhalten wurden. 4.) Metall-freie Entschwefelung. 5.) Ausbeutebestimmung durch HRP-SA. 6.) Oberflächenbindungsanalyse mit FAM-markierten Peptiden.

Zunächst wurden die Wildtyp-SH3-Domänen sowie die Cystein-(A21C) und Penicillamin-(V34Pen)-Mutanten des YSC84- und des ABP1-Hefe-Proteins auf der Oberfläche synthetisiert und analysiert (Abschnitt 4.3, Abbildung 5.1 A). Die Verknüpfung erfolgte mit Hilfe von Cystein und Penicillamin (Pen), da bei beiden Domänen kein Cystein in der Sequenz war. Allerdings befanden sich Ala und Val an geeigneten Positionen. Zu diesen Resten wurde nach erfolgreicher Verknüpfung entschwefelt. Das Bindungsverhalten der SH3-Domänen wurde mit literaturbekannten Bindern auf der Oberfläche analysiert. Die erhaltenen Affinitäten (K_D -Werte), die durch Oberflächen-Fluoreszenzsättigungsanalyse bestimmt wurden, stimmten mit Daten aus der Literatur überein. Auch wurden Ergebnisse der Fluoreszenzsättigungsanalyse auf der Oberfläche mit Bindungsuntersuchungen in Lösung verglichen (Abbildung 5.1 B). Wiederrum waren die berechneten Werte konsistent mit den Oberflächen-bestimmten Daten.

Im Vergleich der nativen Domänen mit den Mutanten wurde festgestellt, dass die Cystein-Substitution einen größeren Einfluss auf die Interaktion zwischen Mutanten-SH3-Domäne und Binder hat, als die Penicillamin-Substitution (Abbildung 5.1 C). Die Größe des Einflusses ist außerdem abhängig von dem Interaktionspartner, daher ist eine Entschwefelungsstrategie notwendig.

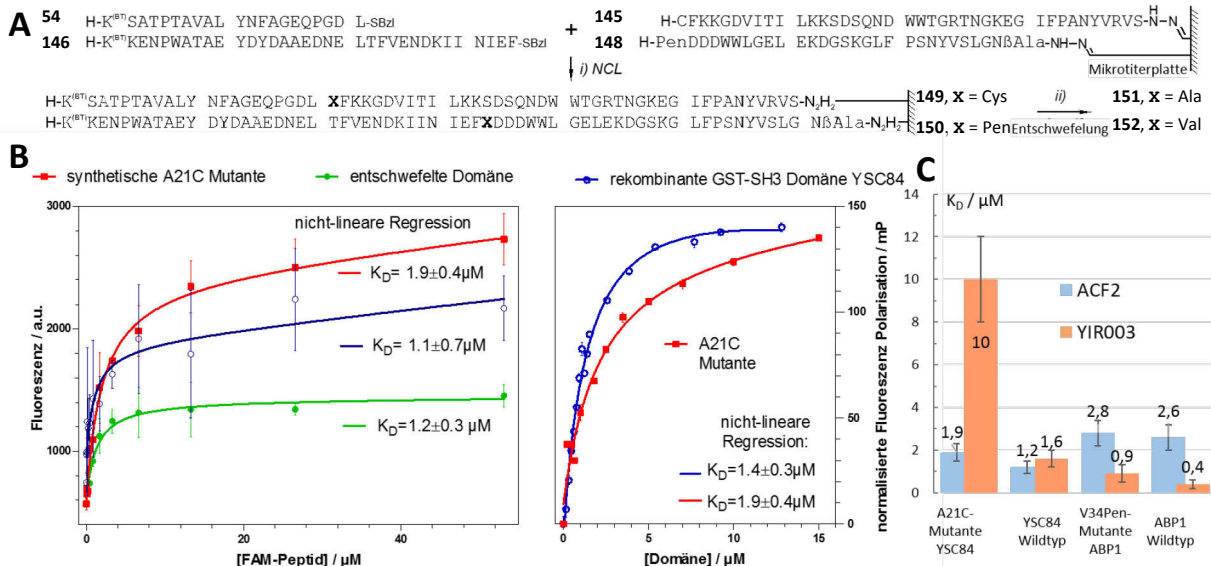


Abbildung 5.1 A: Synthese der SH3-Domänen von YSC84 und ABP1 sowie deren Mutanten auf der Oberfläche. **B:** Vergleich von Affinitäten auf der Oberfläche (links) und in Lösung (rechts) zwischen der SH3-Domäne von YSC84 sowie der A21C-Mutante mit einem bekannten Binder. **C:** Übersicht der gemessenen Affinitäten.

Nachdem die Machbarkeit der Methode an Hand von Hefe-SH3-Domänen gezeigt wurde, wurden humane SH3-Domänen untersucht (Abschnitt 4.5). Es wurden verschiedene Phosphoformen der SH3-Domänen der Abl- und Arg-Tyrosinkinase parallel synthetisiert. Kommerziell erhältliche Kinasen können nur Tyrosin an Position sieben der Abl-SH3-Domäne selektiv phosphorylieren. Mit der in Schema 5.1 gezeigten Methode wurden dementsprechend alle möglichen Tyrosin-phosphorylierten Proteine auf der Oberfläche synthetisiert und funktionell charakterisiert, in dem die Interaktion mit mehreren Bindern parallel gemessen wurde (Abbildung 5.2 A). Dabei stellte sich heraus, dass im Gegensatz zu der bisherigen Literaturmeinung^[198] die Phosphorylierung die Affinität für prolinreiche Liganden nicht generell hemmt. Im Gegensatz wurde teilweise eine verstärkte Bindung beobachtet. In Abbildung 5.2 B sind die gefundenen K_D -Werte sowie die Verhältnisse der K_D -Werte der Phospho-Domänen zu den unphosphorylierten SH3-Domäne aufgeführt. Phosphorylierung scheint die Ligandenerkennung feinregulieren zu können. So wurden die Präferenzen für bestimmte Liganden durch die Phosphorylierung der SH3-Domäne geändert. Beispielsweise bindet die Abl-SH3-Domäne das p41 Peptid im unphosphorylierten Zustand mit höchster Affinität. Nach Phosphorylierung

an Y⁷ werden die Liganden 3BP1 und 3BP2 affiner gebunden. Die Phosphoformen pY⁷pY⁵² und pY⁷pY³⁰pY³⁰ waren hingegen nicht fähig prolinreiche Liganden zu binden. Die Phosphorylierungs-induzierte Veränderung des Erkennungsrepertoires kann mit dem Begriff Phosphoregulierung zusammengefasst werden. Besonders interessant war, dass Phosphorylierung –gleichgültig an welchen Positionen– die Erkennung eines Peptids (ID) aus der Interdomäne, die die Abl-SH2- mit der Kinase-Domäne verbindet, erheblich stört. Dies ist biologisch interessant, da die Interdomänen-SH3-Interaktion ein entscheidender Regulator der Abl-Kinaseaktivität ist. In einer inaktiven Form der Kinase wird ID durch die SH3-Domäne gebunden. Die Kinase wird durch Unterbrechung dieser Bindung aktiviert.^[198] Eine erhöhte Abl-Kinaseaktivität ist der Ursprung vieler Krebs-Transformationen.^[186] Dass die SH3-ID Bindung durch Y⁷-Phosphorylierung gestört wird war bereits bekannt.^[198]

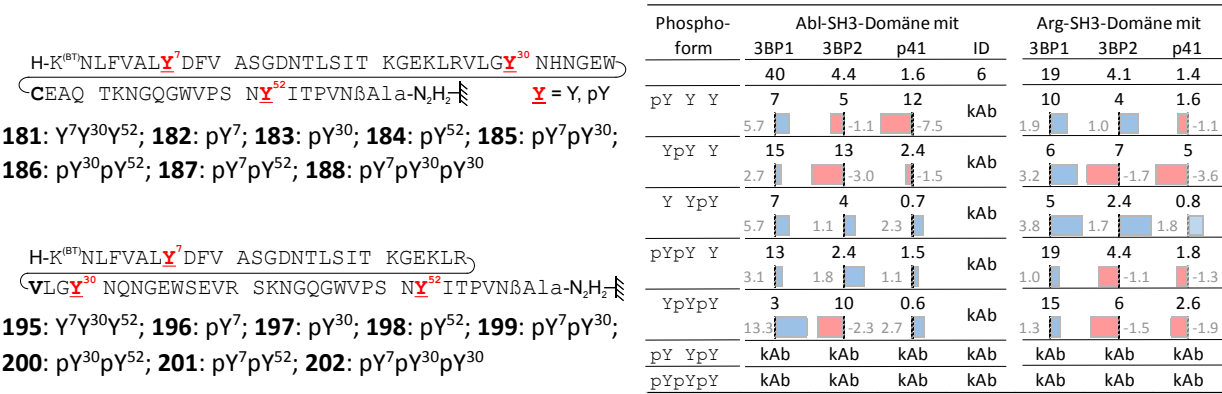


Abbildung 5.2 A: Synthetisierte Sequenzen der Abl- und Arg-(Phospho)SH3-Domänen. **B:** Auf der Oberfläche bestimmte Affinitäten (als KD-Werte in µM) der Abl- und Arg-(Phospho)SH3-Domäne für prolinreiche Peptide sowie Veränderungsfaktoren nach Phosphorylierung (reziprok wenn KD(Phospho) > KD(YYY)); kAb = keine Affinität bestimmbar.

Zur Validierung der Messungen wurden die Bindungen der prolinreichen Peptide mit den (Phospho)SH3-Domänen auch in Lösung charakterisiert (Abschnitt 4.6). Hierzu wurde bei den Titrationen die Fluoreszenzpolarisation FAM-markierter Liganden bzw. die Tryptophan-Emission der Protein-Domänen gemessen. Die Messungen der Tryptophan-Emission erfolgten dabei mit unmarkierten Bindern. Die Trends, die durch Fluoreszenzsättigungstitration an der Oberfläche ermittelt wurden, bestätigten sich (vgl. Abbildung 5.2 B). Bei der Verwendung unmarkierter Liganden wurden ebenfalls gezeigt, dass die Y⁷-Phosphorylierung die Affinität der Abl-SH3-Domäne für 3BP1 erhöht für ID allerdings unterbricht.

In NMR-spektroskopischen Messungen wurde eruiert, wie sich die Tyrosinphosphorylierung auf die Struktur der Abl-SH3-Domäne auswirkt (Abschnitt 4.7). Dabei wurde festgestellt, dass die Y⁷-Phosphorylierung einen relativ geringen Einfluss auf die Struk-

tur der Domäne hat. Hingegen zeigten die im Oberflächenexperiment nicht-funktionellen Domänen pY⁷pY⁵² und pY⁷pY³⁰pY⁵², dass neben dem gefalteten Zustand ein ungefalteter bzw. fehlgefalteter Zustand existierte. Weiterhin wurden Liganden-Titrations durchgeführt. Dies ergab Hinweise auf unterschiedliche Bindungsmodi der Peptidliganden. Das Interdomänen-Peptid bindet vor allem über hydrophobe Wechselwirkungen, wohingegen die anderen, in-trans bindenden Peptidliganden vorwiegend über die beschriebenen Wasserstoffbrücken binden. Darüber hinaus scheint ID eine andere Orientierung einzunehmen als die anderen Liganden. Interessanterweise verschoben sich während der Titration mit dem 3BP1-Liganden besonders die Signale der pY⁷-Domäne, die eine strukturelle Änderung gegenüber der unphosphorylierten Domäne zeigten. Dies legt den Schluss nahe, dass die Y⁷-Phosphorylierung die Konformation der Domäne ändert, so dass die Ligandenerkennung moduliert wird.

Patienten die an der chronischen myeloischen Leukämie (CML) erkrankt sind, weisen eine hohe Konzentration der Bcr-Abl-Kinase auf. Dieses Fusionsprotein entsteht durch eine Chromosomen-Translokation (9q34.1, 22q11.2) der BCR- und ABL-Gene. Das dann exprimierte Bcr-Abl besitzt eine sehr hohe Kinaseaktivität, die mit der Transformation einer undifferenzierten Zelle zur CML-Zelle in Verbindung gebracht wird.^[186] Eine Phosphorylierung an Position sieben in der SH3-Domäne ist sehr häufig und wird als entscheidend für die Tumortransformation angesehen.^[200] Um zu untersuchen ob die Y⁷-phosphorylierte Abl-SH3-Domäne andere Proteine erkennt als die unphosphorylierte Domäne, wurde ein Pulldown-Experiment durchgeführt, bei dem die immobilisierten Domänen mit Zelllysate einer CML-Zelllinie (K562) inkubiert wurden (Abschnitt 4.8). Mit massenspektrometrischen Messungen konnten 3'428 Proteine identifiziert werden, die aus dem Zelllysate angereichert wurden. Davon wurden 78 Proteine selektiv durch Bindung an die pY⁷-Domäne und 67 Proteine an die unphosphorylierte Abl-SH3-Domäne konzentriert (Abbildung 5.3 A und B). Die Ergebnisse wurden durch Literaturdaten unterstützt, denn sechs Proteine, die durch die unphosphorylierte Abl-SH3-Domäne angereichert wurden waren als Binder bekannt.^[256] Aus den angereicherten Proteinen wurden alle prolinreichen Sequenzen mit den Motiven PXXP, PXXXP und PXXXXP ermittelt. Die Aminosäurezusammensetzung der 370 Sequenzen für die Y⁷Y³⁰Y⁵²-Abl-SH3-Domäne sowie der 186 Sequenzen für die Anreicherung durch die pY⁷-Domäne wurden mit Hilfe der *Weblogo*-Internetseite^[258] analysiert (Abbildung 5.3 C). Die prolinreichen Sequenzmuster der von der unphosphorylierten Domäne angereicherten Proteine unterscheiden sich von den Sequenzen, die durch die pY⁷-Domäne angereichert wurden.

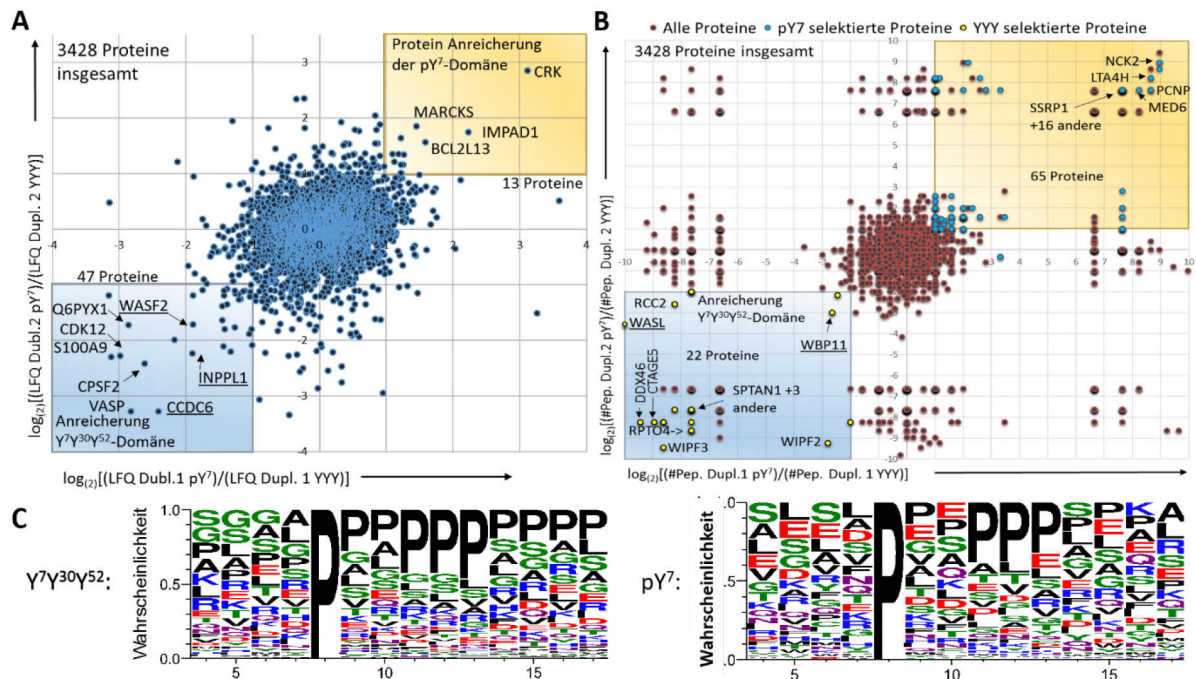


Abbildung 5.3: Ergebnisse des Pulldown-Experiments mit K562-Zelllys (CML) und Inkubation mit auf den Agarose-Kugeln immobilisierter Y7Y30Y52- und pY7-Abl-SH3-Domänen. **A:** Proteinintensitäten (LFQ-Werten) im Verhältnis der Anreicherung durch die pY7- oder die Y7Y30Y52-Abl-SH3-Domäne (negative Werte). **B:** Proteinanreicherung nach der Anzahl an Peptiden. **C:** Prolinreiche Sequenzmotive innerhalb der selektiv erkannten Proteingruppen. LFQ = label free quantification.

So scheint die unphosphorylierte Domäne Sequenzen zu erkennen, die sehr reich an Prolin sind, aber auch häufig Glycin, Alanin und Leucin beinhalten (Abbildung 5.3 C links). Ähnliche Sequenzmuster wurden in einer Untersuchung mit Mikroarrays gefunden, bei denen 237 Liganden für die Abl-SH3-Domäne identifiziert wurden.^[256] Die pY7-Abl-SH3-Domäne reichte dagegen Sequenzen mit vergleichsweise weniger Prolin an. Diese zeigten dafür eine größere Häufigkeit an Glutaminsäure, Serin und Lysin (Abbildung 5.3 C rechts).

Mit der in dieser Dissertation entwickelten Methode wurden insgesamt 20 SH3-Domänen auf der Oberfläche synthetisiert. Bindungsmessungen im Parallelformat gestatteten die Charakterisierung von 64 Protein-Peptid-Interaktionen. Vergleichend wurden Synthese und Testung in Lösung vorgenommen (Abschnitt 4.6) Für die Synthese von sechs Domänen und die Charakterisierung von 24 Protein-Peptid-Interaktionen wurde ein Jahr benötigt (43 Tage/Domäne). Hingegen gelang die Synthese von 16 Domänen und Testung von 56 Protein-Peptid-Interaktionen auf der Oberfläche (Abschnitt 4.5.1) in nur vier Monaten (5 Tage/Domäne).

5.2 Ausblick

In dieser Arbeit wurde deutlich, dass besondere Maßnahmen getroffen werden müssen, um die unspezifische Bindung von Peptiden mit dem Mikrotiterplattenmaterial (Polystyrol) zu reduzieren. Eine Immobilisierung auf Glas wäre vermutlich von Vorteil, da unspezifische Adsorption durch hydrophobe Wechselwirkung kaum stattfindet. Aldehyd-funktionalisierte Glaträger sind kommerziell erhältlich. Generell können durch die Verwendung von Glaträgern und Spottern höhere Stückzahlen und Dichten an untersuchbaren Proteinen erreicht werden. So wurden beispielsweise von *Jones et al.* alle 106 humanen SH2- und 41 PTB-Domänen auf Aldehyd-modifizierten Glaträgern immobilisiert und untersucht.^[268] Die Affinitäten der rekombinant gewonnenen Domänen wurden zu 66 chemisch-hergestellten Peptiden bestimmt. Insgesamt wurden 10'494 Interaktionen von 159 Protein-Domänen mit 66 Peptiden analysiert. Die hier entwickelte Methodik könnte ebenso auf Glaträgern durchgeführt werden. Es können mit einem Spotter hunderte bis tausende Spots auf eine Glasoberfläche gebracht werden. Bindungsmessungen könnten im Anschluss mit Spotter oder uniform durchgeführt werden. Besonders interessant an der chemischen Methode wäre der Einfluss von PTMs auf die Proteinerkennung zu untersuchen. Würde z.B. Phosphorylierung untersucht werden, ergäbe sich für jedes Protein eine exponentielle Kombinationsvielfalt von $K = 2^n$ (n = Anzahl an Phosphorylierungsstellen). Aus synthetischer Sicht ist die Darstellung von (Phospho)Proteinen mittels NCL auf der Oberfläche außerdem sehr praktisch, da die Anzahl der zu synthetisierenden Peptide immer kleiner ist als die Anzahl an (Phospho)Kombinationen (K). Beispielsweise waren für die Abl-(Phospho)SH3-Domänen mit drei Phosphorylierungsstellen acht Kombinationen möglich. Für die Synthese wurden aber lediglich sechs Phosphopeptide benötigt. Bei vier Phosphorylierungsstellen könnten 16 Domänen mit acht Phosphopeptiden synthetisiert werden.

Um eine solche Synthese von Protein-Arrays im Hochdurchsatz zu ermöglichen, wäre es hilfreich, wenn die Peptidfragmente ohne HPLC-Reinigung dargestellt werden könnten. Bei der in dieser Arbeit verwendeten selbstreinigenden Peptidthioestersynthese stellt sich die Adsorption der geschützt vorliegenden Abbruchsequenzen an den polymeren Träger als problematisch dar. Zwar ergaben sich durch die Verwendung PEG-basierter Harze Verbesserungen, allerdings konnte die Adsorption „schwieriger“ Abbruchpeptide nicht vollständig verhindert werden. Somit zeigt der Selbstreinigungseffekt nur eine geringe Verlässlichkeit bei langen und hydrophoben Sequenzen.

Nach der TFA-Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen sind die Peptide wesentlich besser löslich als im geschützten Zustand. Strategien welche die gezielte Immobilisierung des Volllängenpeptids in einer Mischung aus entschützten Peptiden ermöglichen, sollten daher wahrscheinlich robuster verlaufen (Abschnitt 2.4.1). Eine solche Technik wurde zum Patent angemeldet und soll im Rahmen des Gründungsprojekts *EnviroPep* zur Marktreife optimiert werden.^[269]

Eine weitere Möglichkeit der Proteinsynthese ohne HPLC-Reinigung ist ein Konzept, das unter anderen auf Arbeiten dieser Promotion aufbaut. *Loibl et al.* haben eine Methode entwickelt, um MUC-Proteine im Parallelformat über Auxiliar-vermittelte NCL als Rohprodukte mit hoher Reinheit herzustellen.^[270] Es wurde ein His₆-Thioesterfragment *N*-terminal auf Ni-NTA-Agarosekugeln verankert und mit einem 2-Mercaptophenethyl (**21**) Auxiliar-modifizierten Peptidhydrazid umgesetzt. Nach der Ligation und Auxiliarabspaltung wurde das native Peptid durch Ansäuern vom Träger getrennt und mittels der in Abschnitt 4.3.1 beschriebenen reversiblen Hydrazon-Ligation auf Aldehyd-funktionalisierte Agarose-Sphären immobilisiert. Nach Waschen mit geringen Mengen Wasser konnten die Proteine mit hohen Reinheiten (90-98%) mittels Hydrazin vom Harz getrennt werden.

Der Mechanismus der Phosphoregulierung der Abl-SH3-Domäne ist noch nicht geklärt. In dieser Arbeit konnten erste Hinweise dazu gewonnen werden. Für eine detailliertere Erkenntnis wären Strukturen der Abl-(Phospho)SH3-Domänen wünschenswert, idealerweise in Interaktion mit verschiedenen Bindern. Gegenwärtig wird von *Dr. Andre Dallmann* versucht die Struktur von der ¹³C- und ¹⁵N-markierten rekombinanten Abl-Y⁷Y³⁰Y⁵²- und der pY⁷-SH3-Domäne NMR-spektroskopisch zu erhalten. Mit den so erhaltenen Strukturdaten sollen die NMR-Spektren der chemisch synthetisierten (Phospho)Domänen verglichen werden. Es ist geplant Strukturen der Phosphodomänen ausgehend von diesen Informationen zu berechnen.

Die Ergebnisse des Pulldown-Experiments sollen außerdem weitergehend untersucht werden. Die Affinitäten ausgewählter spezifisch-angereicherter Sequenzen zu der Y⁷-phosphorylierten sowie zu der unphosphorylierten Abl-SH3-Domäne sollen in Lösung getestet werden. Darüber hinaus sollen die laut *Prosites*-Suche^[257] und *Weblogo*-Analyse wahrscheinlichsten Bindungs-Sequenzen ebenfalls in Lösung getestet werden (Abbildung 5.3 C). Für die Y⁷Y³⁰Y⁵²-Domäne wäre das die Sequenz SGGAPPPPPPPPPPP und für die pY⁷-SH3-Domäne SLSLPPEPPPPSPKA.

Darüber hinaus sind weitere Pulldown-Experimente mit anderen Phospho-SH3-Domänen denkbar. Diese würden vermutlich weitere Bindungs-Präferenzen zeigen, die vom Phosphorylierungsmuster abhängig sind. Eine erschöpfende Analyse der durch die Y⁷-phosphorylierte Abl-SH3-Domäne angereicherten Proteine wäre aus biologischer Sicht sehr wünschenswert. Besonders hinsichtlich bekannter und vielleicht noch unbekannter Signalkaskaden, die eventuell eine Rolle in der Tumorprogression spielen.

6. Kapitel: Experimenteller Teil

6.1 Materialien und Messgeräte

Chemikalien

Fmoc-geschützte Aminosäuren, HOBt und die 4-Sulfamylbutyrl-Säure wurden von *Novabiochem* (Schwalbach), *Bachem* (Bubendorf, Schweiz), *Iris Biotech* (Marktredwitz) oder *Carbolutions* (Saarbrücken) bezogen. HCTU wurde von *Carl ROTH* (Karlsruhe) gekauft. PS Aminomethyl (AM) und Tentagel R Ram (Rinkamid) Harze wurden von *Rapp Polymere* (Tübingen) bezogen. AM-ChemMatrix Harz wurde von *Sigma-Aldrich* (Schnelldorf) geliefert. *Oxyma Pure* wurde freundlicherweise kostenfrei von *Luxembourg Biotechnologies Lbt.* (Rehovot, Israel) gespendet. Der Fmoc-Tyr[PO(NMe₂)₂]-OH Baustein **42** wurde entsprechend literaturbekannten Vorschriften hergestellt.^[128] DMF *low in water* wurde von *VWR* (Darmstadt) bezogen. Ni²⁺- und Maleimid-funktionalisierte 96-Kavitäten-Mikrotiterplatten, der HRP-SA Komplex und *1-Strep Ultra TMB ELISA* Lösung wurde von *Thermofisher (Pierce)* gekauft. Chemikalien für die SPSS (Essigsäureanhydrid, 2,6-Lutidin, Piperidin, NMM, DIEA, NMP) wurden von *Acros Organics* (Geel, Belgien) bezogen. Chemikalien für Synthesen in Lösung wurden von folgenden Herstellern bezogen: *Sigma Aldrich*, *Alfa Aesar* (Karlsruhe), *TCI* (Eschborn), *Merck* (Darmstadt) und *ABCR* (Karlsruhe). Wasser wurde mit einer *Milli-Q Ultra-Pure* Wasseraufreinigungsanlage der Firma *Merck* gereinigt. Falls nicht anderes angegeben wurde als Wasser immer Wasser verwendet, welches mit der *Milli-Q Ultra-Pure* Wasseraufreinigungsanlage gereinigt wurde. Trockene Lösungsmittel wurden mit einer *SPS 800* Lösungsmittel Reinigungsanlage von *mBraun* getrocknet.

Dünnschichtchromatographie

Reaktionsverläufen wurden auf Dünnschichtchromatographie-Platten (Kieselgel 60 F254) der Firma *Merck* untersucht. Die Substanzen wurden durch folgende Methoden sichtbar gemacht: UV-Licht der Wellenlänge $\lambda = 254$ nm, Ninhydrin (300 mg Ninhydrin, 3 ml Essigsäure, 197 ml Ethanol), Kaliumpermanganat (1.5g KMnO₄, 10g K₂CO₃ und 1.25ml 10 vol.% NaOH in 200 ml H₂O), Iod (einige Iodkristalle in ein 100 ml Sand) Cer-Molybdat Reagenz (0.5g Ce(NH₄)₂(NO₃)₆, 24.0 g (NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4H₂O, 28 ml H₂SO₄, 72 ml H₂O), Molybdatophosphorsäure (10 g H₃Mo₁₂O₄₀P in 100 ml EtOH), *Seebach*-Reagenz (2.5 g Molybdatophosphorsäure, 1 g

Cer(IV)sulfat, 6 ml konz. H_2SO_4 , 94 ml H_2O) und Ellmans-Reagenz (50 mg 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure) in 10 ml 0.1 M NaH_2PO_4 -Puffer pH 7).

Säulenchromatographie

Für die manuelle präparative Säulenchromatographie wurde Kieselgel 60 (0.063-0.200 mm) der Hersteller *Merck* und *Acros Organics* verwendet. Als mobile Phase dienten verschiedene Lösungsmittelgemische von technischer Reinheit, die bei den einzelnen Versuchen beschrieben werden. Die Trennung wurde mit einem Druck von 0.5 – 1 bar.

NMR-Spektroskopie

Die NMR-Spektren der organischen Verbindungen wurden auf einem *Avance II 300* (300 MHz) und einem *Avance II 400* (400 MHz) Spektrometer der Firma *Bruker* gemessen. Die Messungen der Protein-Domänen erfolgten mit einem *Avance II 500* (500 MHz) Gerät. Die Signale der verbliebenen Protonen in den deuterierten Lösungsmitteln wurden als Referenzen für eine Verschiebungs-Kalibrierung verwendet. ^1H -NMR-Spektren ($\text{CDCl}_3 = 7.26$ ppm, $\text{DMSO}-d_6 = 2.50$ ppm, $\text{CD}_3\text{OD} = 3.31$ ppm). Die ^{13}C -NMR-Spektren wurden breitbandentkoppelt aufgenommen und es wurde ebenfalls auf das entsprechende Lösungsmittelsignal als interner Standard kalibriert ($\text{CDCl}_3 = 77.0$ ppm, $\text{DMSO}-D_6 = 39.43$ ppm, $\text{CD}_3\text{OD} = 49.05$ ppm).^[271] Die chemischen Verschiebungen δ sind in ppm, die Kopplungskonstanten J sind in Hz angegeben. Zur Bezeichnung der Signalmultiplizitäten wurden folgende Abkürzungen verwendet: s = Singulett, d = Dublett, dd = Dublett vom Dublett, dt = Dublett vom Triplett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multiplett, b = breit.

Hochaufgelöste Massenspektrometrie

Hochaufgelöste Massenspektren (HRMS) wurden mit einem *Finnigan* LTQ-FT-ICR oder einem *Applied Biosystems QstarXL* Spektrometer, mittels ESI (negativ und positiv) Ionisierung, gemessen. Die durch Imidazol-Verdrängung von den Ni-NTA Platten erhaltenen Ligations- und Entschwefelungsprodukte (Abschnitt 4.1.2, Seite 49) wurden mit einem Nano-FT-ICR Messgerät der Firma *ThermoFisher* vermessen.

MALDI/TOF-Massenspektrometrie

Die MALDI/TOF-Massenspektren wurden mit Hilfe eines *Voyager-DE Pro Biospectrometry Workstation* Gerätes der Firma *PerSeptive Biosystems*, sowie eines *AXIMA Confidence* Spektrometers von *Shimadzu* aufgenommen. Als Matrices dienten

folgende Lösungen (1 ma.%): 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) oder Sinapinsäure (*trans*-3,5-Dimethoxy-4-hydroxyzimtsäure) in ACN/H₂O (1:1, 0.1% TFA).

Analytische HPLC

Analytische LC-MS Messungen auf der HPLC wurden bei 50°C ausgeführt. Dazu wurde ein *Agilent 1100 series* Instrument verwendet (Säulen: *Varian, Polaris 5 C18 A-100* x 4.6 mm) und Lösungsmittel A (98.9% H₂O, 1% ACN, 0.1% Ameisensäure) und B (98.9% ACN, 1% H₂O, 0.1% Ameisensäure) in einem linearen Gradienten (20 min) mit einer Flussrate von 0.3 ml/ min. Die Detektion wurde durch einen UV-VIS-Detektor der Wellenlänge $\lambda = 210$ nm und 278 nm bewerkstelligt. Die MS-Detektion erfolgte mittels ESI-MS Quadrupole.

Analytische UPLC

Analytische LC-MS Messungen auf der UPLC wurden bei 50°C ausgeführt. Dazu wurde ein *Waters ACQUITY UPLC QDa* System verwendet (Säulen: *ACQUITY UPLC BEH C18 1.7* μ m) und Lösungsmittel A (98.9% H₂O, 1% ACN, 0.1% TFA) und B (98.9% ACN, 1% H₂O, 0.1% TFA) in einem linearen Gradienten (4 min) mit einer Flussrate von 0.3 ml/ min. Die Detektion erfolgte durch einen variablen UV-VIS Detektor, wobei sich aber häufig auf die Wellenlängen $\lambda = 210$ nm und 278 nm beschränkt wurden. Für die Messungen der Racemisierungsraten der Erstbeladung auf das Sulfoamid-Harz (Abschnitt 4.4.1, Seite 72) wurde die Wellenlänge $\lambda = 300$ nm verwendet. Die MS-Detektion erfolgte mittels ESI-MS Quadrupole.

Präparative HPLC

Präparative Peptidreinigung wurde auf einer *Agilent 1100 series* HPLC bei Raumtemperatur durchgeführt (Säule *VP250/21 Nucleodur C18 Gravity* 250 mm x 21 mm, 5 μ m von *Macherey-Nagel*). Es wurden die Lösungsmittelgemische A und B bei einem Fluss von A (98.9% H₂O, 1% ACN, 0.1% TFA) und B (98.9% ACN, 1% H₂O, 0.1% TFA) in einem linearen Gradienten (30 min) mit einer Flussrate von 15 ml/ min. Die Reinigungen der Protein-Domänen erfolgte im Semi-Präparativen Modus auf einer kleineren Säule (*Polaris C18-A column* (250 x 10.0 mm, 5 μ m) von *Varian*) mit einem geringeren Fluss von 6 ml/min. Die Detektion erfolgte durch einen UV-VIS Detektor der Wellenlänge $\lambda = 210$ nm und 278 nm. Die erhaltenen Fraktionen wurden mittels MALDI oder UPLC/MS analysiert und die ermittelten Produktfraktionen wurden vereinigt.

Affinitätschromatographie

Rekombinant erhaltene GST-Fusionsproteine wurden auf einem *FPLC ÄKTA Pure System* (*Fast protein liquid chromatography* (FPLC)) der Firma *General Electric* (GE) gereinigt. Dazu wurden GSH-Sepharose Säulen verwendet (*GSTrap HP* auch von GE).

Photometrie

Die UV-Vis-Messungen zur Bestimmung der Stoffmenge des Fulven-Piperidin-Addukt in der DMF-Piperidin Abspaltlösung wurden an einem *SmartSpecPlus Spectrophotometer* der Firma *BioRad* durchgeführt. Die Bestimmung der Konzentrationen von Peptiden erfolgte mittels *ND-1000 Spectrophotometer* der Firma *NanoDrop*. Vor jeder Messung wurden die verwendeten Lösungsmittel gemessen um den Nullwert zu ermitteln.

Fluoreszenzspektroskopie

Fluoreszenzspektren wurden mit einem *Cary Eclipse* Fluoreszenzspektrometer der Firma *Varian* gemessen. Die Messungen wurden in 1 ml oder 125 µl Küvetten der Firma *Hellma* und in PBS-Puffer durchgeführt, sofern nicht anders im jeweiligen Experiment beschrieben.

Absorptions- und Fluoreszenzmessungen auf Mikrotiterplatten

Die Absorption und Fluoreszenz in 96-Kavitäten-Mikrotiterplatten wurden mit dem Plattenlesegerät *Victor X3* von *PerkinElmer* gemessen. Absorptionen wurde im Zuge des HRP-SA Assays in durchsichtigen Mikrotiterplatten bestimmt. Die Messzeit betrug 1 Sekunde pro Kavität. Absolute Fluoreszenzen für die Fluoreszenzsättigungs-Bindungsmessung wurden in Domänen modifizierten schwarzen 96-Kavitäten-Multititerplatten bestimmt (Messzeit 1 Sekunde). Fluoreszenzpolarisation wurde in schwarzen 96- und 384-Kavitäten-Mikrotiterplatten gemessen (Messzeit 1 Sekunde). Alle Mikrotiterplatten bestanden aus Polystyrol.

Festphasenpeptidsynthese

Alle Peptide wurden durch Festphasensynthese (SPPS) nach der Fmoc/*t*Bu - Strategie in Spritzenreaktoren synthetisiert. Abweichungen vom Protokoll sind in den entsprechenden Absatz angegeben. Die manuelle Festphasenpeptidsynthese wurde in 3 ml oder 6 ml Spritzenreaktoren mit Teflonfritten (Porengröße 50 µm) der Firma *MultisynTech* (Witten) durchgeführt. Die automatisierte Peptidsynthese wurde in 5-25 µmol Ansätzen durch einen *MultiPep RS*-Peptidsyntheseautomaten der Firma *Intavis AG*

(Köln) durchgeführt. Es wurden dafür 3 ml (*MultisynTech*) und 5 ml Spritzenreaktoren der Firma *Intavis AG* verwendet.

UV-Methoden zur Bestimmung von Aminosäure-Kupplungsausbeuten

Quantitative Bestimmung der Kupplungsausbeuten mittels Fulven-Piperidin Addukt:

Nach erfolgter Kupplung wurde das Harz fünfmal mit DMF gewaschen. Anschließend wurde das Harz zweimal je zwei Minuten mit einer DMF/Piperidin-Lösung behandelt (4:1), wobei das Filtrat aufgefangen wurde. Nach Nullwertbestimmung der DMF/Piperidin-Lösung wurde ein Aliquot des Filtrats (V_{Aliquot}) auf 1 ml verdünnt und die Absorption der Lösung mittels *BioRad* Spektrometer bei 301 nm vermessen. Die Stoffmenge wurde dabei über die Gl. 5 bestimmt und konnte für eine Ausbeute Berechnung verwendet werden. Diese Gleichung wurde von dem *Lambert-Beerschen Gesetz* abgeleitet.

$$n = \frac{A \cdot V_{\text{gesamt}} \cdot V_{\text{Küvette}}}{V_{\text{Aliquot}} \cdot \epsilon \cdot d} \quad \text{Gl. 5}$$

n = Stoffmenge des Fulven Piperidin Addukts, A = Absorption, V_{gesamt} = gesamtes Volumen der Abspaltung, V_{gesamt} = Volumen in der Messküvette, V_{Aliquot} = Proben Aliquot aus Filtrat, ϵ = molarer Extinktionskoeffizient ($\epsilon_{301} = 8'300 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), d = Schichtdicke (1 cm).

Bestimmung des Beladungsgrads von Fmoc-beladenem Harz:

Für die Bestimmung des Beladungsgrads wurde eine bestimmte Menge Harz (m_{Harz}) eingewogen und diese wurde nach dem Quellen mit DMF wie oben beschrieben mit einer DMF/Piperidin-Lösung behandelt. Nach Gl. 5 wurde dann die Stoffmenge bestimmt und die Beladung ergab sich dabei aus Gl. 6. Diese Methode kann auch verwendet werden, um Kupplungsausbeuten während der Peptidsynthese zu bestimmen.

$$b = \frac{n}{m_{\text{Harz}}} \quad \text{Gl. 6}$$

b = Beladung des Harzes, m_{Harz} = Masse des zu bestimmenden Harzes

Bestimmung freier Aminogruppen am Harz (Bromphenolblau-Test):

Eine bestimmte Menge Harz wurde eingewogen. Nach dem Quellen mit DMF wurde dieses Harz mit einer 15 mM Lösung aus Bromphenolblau in DMF 10 min behandelt. Das Bromphenolblau bindet dabei ionisch an freie Aminogruppen auf dem Harz. Anschließend wurde mit Ethanol gewaschen, wobei eine bräunlich gelbe Lösung erhalten wurde. Das Waschen wurde wiederholt bis keine Gelbfärbung mehr auftritt. Anschließend wurde mit 1 vol.% DIEA Lösung das Bromphenolblau in einen Messzylinder elu-

iert (leuchtend blau). Nach Nullwertbestimmung und Verdünnung wurde die Absorption bei $\lambda = 605$ nm bestimmt. Es kann eine Beladung nach Gl. 6 mit Hilfe von Gl. 5 berechnet werden ($\epsilon_{605} = 106'590 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).^[272] Bei dem ChemMatrix-Harz konnte eine Stoffmengenbestimmung mittels Bromphenolblau nicht durchgeführt werden, da das Bromphenolblau unspezifisch im Harz verbleibt.

TNBS-Test freier Aminogruppen:

Um die Kupplungseffizienz grob abzuschätzen, kann ein qualitativer optischer Test mit wenigen Harzkugeln durchgeführt werden. Es wurden wenige Kugeln des zu testenden Harzes entnommen und in ein Eppendorf-Plastikgefäß transferiert. Das Harz wurde zuerst mit drei Tropfen einer 10 vol.% DIEA DMF Lösung versetzt. Anschließend wurde ein Tropfen 1 M wässriger 2,4,6-Trinitrobenzensulfonsäure (TNBS) hinzugegeben. Nach 5-minütigen Schütteln können die Sphären begutachtet werden. Es empfiehlt sich den Überstand zu entfernen und die Harzkugeln in DMF aufzunehmen. Rotfärbung deutet auf unvollständige Kupplung hin. Bei farblosen Harzkugeln kann von einer Ausbeute über 90% ausgegangen werden.^[273]

Methoden zur Bestimmung von Peptid- oder Proteinkonzentration

Konzentrationen von Peptiden oder Proteinen die einen Tyr ($\epsilon_{278} = 1'400 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), Trp ($\epsilon_{278} = 5'600 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) oder pTyr ($\epsilon_{278} = 650 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)-Rest beinhalteten durch Messen der Absorption (bei $\lambda = 278$ nm bzw. 494 nm) an einem NanoDrop *ND-1000* Spektrometer bestimmt, unter Berücksichtigung des molaren Extinktionskoeffizienten des Peptids. Dieser wurde berechnet als Summe der oben angegebenen Werte für jeden entsprechenden Aminosäurerest.^[274] Konzentrationen von Peptiden, die mit FAM markiert waren ($\epsilon_{494} = 66'000 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, pH = 8.4) wurden im 0.1 M NaHCO₃-Puffer bei pH 8.4 gemessen.^[221] Die Stoffmengen wurden nach Gl. 5 berechnet. Stoffmengen von Peptiden, die keine der aufgeführten Reste trugen, wurden durch Wiegen des lyophilisierten Peptids und Auflösen in einem bestimmten Volumen berechnet. Hinweis: Basische Aminosäurereste (Arg, Lys, His), der freie *N*-Terminus sowie das *C*-terminale Hydrazid bei den Peptidhydraziden wurden als ihre entsprechenden TFA-Salze angenommen.

6.2 Verzeichnis verwendeter Puffer und Waschlösungen

Tabelle 6.1: Übersicht über die verwendeten Puffer.

Name	Reagenzien in Wasser (<i>Millipore</i>)
Immobilisierungspuffer	100 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 7.4
Waschpuffer	10 mM NaH ₂ PO ₄ , 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 2% Tween, pH 7.0
Selektivitätspuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 25 mM Lysin, 1 mM EDTA, 0.05% Tween, 3 ma.% BSA, pH 7.0
Waschpuffer 2	10 mM NaH ₂ PO ₄ , 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 0.05% Tween, pH 7.0
Additionspuffer	0.1 M NaH ₂ PO ₄ , 20 mM TCEP, pH 6.5
Additionspuffer 2	0.1 M NaH ₂ PO ₄ , 20 mM NaCNBH ₃ , 4 mM TCEP, pH 6.5
Blockierungspuffer	100 mM NaH ₂ PO ₄ , 10 µg/ml <i>N</i> -Ac-Cystein, pH 6.5
Blockierungspuffer 2	100 mM NaH ₂ PO ₄ , 20 mM Na(CN)BH ₃ , 1 mM TCEP, 10 µg/ml Mercaptoethanol, pH 8
HEPES CuAAC-Puffer	20 mM HEPES, 1 µM CuSO ₄ , 2 µM THPTA, 1 mM TCEP, 0.5 M NaCl, pH 8
Phosphat CuAAC-Puffer	0.1 M NaH ₂ PO ₄ , 20 mM NaCNBH ₃ , 1 µM CuSO ₄ , 2 µM THPTA, 10 µM NaAsc., pH 8
Konjugationspuffer	0.1 M NH ₄ OAc, 0.1 M PhNH ₂ , pH 4
Ligationspuffer	0.1 M Na ₂ HPO ₄ , 3 M GdmCl, 50 mM NaAsc, 20 mM TCEP, pH 7.5
Ligationspuffer 2	0.1 M Na ₂ HPO ₄ , 3 M GdmCl, 50 mM NaCHBH ₃ , 50 mM MesNa, 50 mM NaAsc, 20 mM TCEP, 0.1 ma.% RBR, pH 7.5
Ligationspuffer 3	0.2 M NaH ₂ PO ₄ , 6 M GdmCl, 50 mM PhSH/MPAA, pH 7
Entschwefelungspuffer	0.1 M NaH ₂ PO ₄ , 3 M GdmCl, 0.2 M VA-044, 0.25 M TCEP, 80 mM <i>t</i> BuSH für <i>Cys</i> oder 80mM GSH für <i>Pen</i> , pH 6.8
PBS-Puffer	0.1 M Na ₂ HPO ₄ , 20 mM KH ₂ PO ₄ , 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 3 mM NaN ₃
FP-Puffer	0.1 M Na ₂ HPO ₄ , 100 µg/ml bovine γ-globulin, 0.02 w% NaN ₃ , pH 7.4
SDS-Puffer	125 mM Tris, 20 vol.% Glycerin, 5 vol.% β-Mercaptoethanol, 4 ma.% SDS, pH 6,8
SDS-Probenpuffer	SDS-Puffer + 0.02 ma.% Bromphenolblau
Zellaufschluss-Puffer	25 mM Tris, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM KCl, 0.5 mM Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure (EGTA), 1 vol.% NP-40, 1 mM Na ₃ VO ₄ , 1 mM DTT, je 1 Tablette auf 10 ml Protease und Phosphatase-Inhibitor (<i>cOmplete EDTA-free</i> sowie <i>PhosphoSTOP</i>), pH 7.5.

6.3 Allgemeine Syntheseprotokolle

6.3.1 Manuelle Festphasen-Peptidsynthese

Fmoc-Abspaltung: Das Harz wurde mit 500 µl DMF/Piperidin (4:1) behandelt. Nach 2 min wurde die Lösung vom Harz durch Filtration getrennt. Die Behandlung wurde einmal wiederholt. Abschließend wurde das Harz gewaschen (3x DMF, 3x DCM, 3x DMF).

Kupplung: Zu einer Lösung von 4 Äq. Aminosäurederivat (bezogen auf die anfängliche Fmoc-Beladung) in DMF (Endkonzentration 0.2 M) wurden HCTU (3.8 Äq.), HOBt oder Oxyma (4 Äq.) und DIEA (12 Äq.) hinzugefügt. HOBt wurde für die Peptidsynthesen der Unterkapitel 4.1-4.3 und Oxyma für 4.4-4.8 verwendet. Die Lösung wurde für eine Minute geschüttelt (Voraktiviert) und anschließend zu dem Harz gegeben. Nach 30-45 min wurde das Harz gewaschen (3x DMF, 3x DCM, 3x DMF).

Blockierung: Um nicht umgesetzte Amino-Termini zu acetylieren, wurde eine Blockierlösung zu dem Harz gegeben ($\text{Ac}_2\text{O}/2,4\text{-Lutidin}/\text{DMF}$ (5:6:89)). Die Suspension wurde 5 min geschüttelt. Danach wurde das Harz gewaschen (3x DMF, 3x DCM, 3x DMF).

Freisetzung vom polymeren Träger: Das Harz wurde 2 h bei Raumtemperatur mit einer Lösung von 96% TFA, 2% H_2O und 2% TIS behandelt. Im Fall von schwefelhaltigen Sequenzen (Cys, Met) wurde der Anteil an H_2O auf 1.5% reduziert und 0.5% Ethandithiol (EDT) hinzugefügt. Wenn sich mehr als zwei Arg-Reste in der Sequenz befanden, wurde 2% Thioanisol und eine reduzierte Menge von 94% TFA verwendet. Falls sich der Phosphotyrosinbaustein **42** im Peptid befand wurde nach 2 h 10% H_2O zugegeben und die Abspaltungsmischung wurde in ein Plastikgefäß (15 ml) überführt. Die Abspaltungszeit wurde auf insgesamt 18 Stunden verlängert. Das Rohpeptid wurde durch Zugabe von Diethylether ausgefällt ($\text{Et}_2\text{O}/\text{Abspaltlösung}$ 10:1). Nach Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das verbleibende Pellet wurde in $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}/\text{TFA}$ gelöst (1:1:0.1%). Die Peptide wurden bei -25°C gelagert. Die Rohprodukte wurden durch HPLC oder UPLC-ESI-MS und MALDI-TOF-MS charakterisiert und ohne weitere Reinigung verwendet. Die Ausbeuten wurden bei 278 nm mittels optischer Dichte oder durch Einwaage bestimmt.

6.3.2 Automatische Festphasen-Peptidsynthese

Automatisierte Festphasensynthese wurde in 5, 10 und 25 μmol Ansätzen unter Verwendung von 3 ml oder 5 ml (25 μmol) Spritzenreaktoren an einem *MultiPep RS* Peptidsyntheseautomaten der Firma *Intavis AG* durchgeführt. Die angegebenen Mengen unten entsprechen einem 5 μmol Ansatz.

Fmoc-Abspaltung: Das Harz wurde mit 500 μl DMF / Piperidin (4:1) 6 min behandelt. Die Behandlung wurde einmal für 2 min wiederholt. Abschließend wurde das Harz mit DMF gewaschen (6x 400 μl).

Kupplung: Ein Voraktivierungsbehälter wurde mit einer DMF-Lösungen aus 4 Äq. Aminosäurederivat, HCTU (3.8 Äq.), Oxyma Pure (4 Äq.) und NMM (10 Äq.) befüllt. Die Reaktanten wurden homogenisiert. Nach 1 min Voraktivierungszeit wurde die Lösung auf die Spritzenreaktoren gegeben. Nach 30 min wurde das Harz mit DMF gewaschen (3x 400 μl).

Blockierung: Um nicht umgesetzte Amino-Termini zu acetylieren, wurde eine Blockierlösung zu dem Harz gegeben ($\text{Ac}_2\text{O}/2,4\text{-Lutidin}/\text{DMF}$ (5:6:89)). Nach 5 min wurde das Harz gewaschen (3x 400 μl).

Nach der Assemblierung des linearen Peptids wurde das Harz schließlich mit DMF (6x 400 μl) und DCM (6 x 400 μl) gewaschen.

6.4 Experimentelle Vorschriften zu Unterkapitel 4.1

6.4.1 Selbstreinigende Peptidthioestersynthese auf PS-Harz

Synthese des 4-Sulfamylbutyryl-(PhiPr)glutamyl-Glycin-Polystyrol-Harzes 47: PS AM NH_2 -Harz 500 mg, (Beladung 1.02 mmol/g) wurde 30 min in 3 ml DMF in einem Spritzenreaktor gequollen. Eine 0.4 M Lösung von Fmoc-Gly-OH (2.06 mmol, 595 mg), PyBOP (2.06 mmol, 1041 mg) und 12 Äq. DIEA in DMF wurde zu dem Harz gegeben. Nach 1 Stunde Schütteln bei Raumtemperatur wurde das Harz gewaschen (5x DMF, 3x DCM und 3x DMF). Zur Blockierung der freien *N*-Termini wurde dem Harz $\text{Ac}_2\text{O}/2,4\text{-Lutidin}/\text{DMF}$ (5:6:89) zugesetzt und diese Acetylierung-Mischung wurde 5 min geschüttelt. Danach wurde das Harz gewaschen (3x DMF, 3x DCM, 3x DMF). Anschließend wurden 3 ml DMF/Piperidin (4:1) 5 min zu dem Harz gegeben. Die Behandlung wurde einmal 2 min wiederholt, anschließend wurde das Harz gewaschen (5x DMF, 3x DCM, 3x DMF). Eine Beladungsausbeute von 94% wurde durch Stoffmengenbestimmung aus der Absorption der Fmoc-Abspaltungslösung bei 301 nm mit Gl. 5

berechnet. Anschließend wurde eine Lösung von 1.2 Äq. Fmoc-Glu(PhiPr)-OH (0.618 mmol, 301 mg), 1.1 Äq. HCTU (0.566 mmol, 234 mg), 1.2 Äq. Oxyma (0.618 mmol, 88 mg) und 3 Äq. DIEA (263 µl) zu dem Harz gegeben, und diese Mischung wurde 5 min geschüttelt mit anschließendem Waschen (3x DMF, 3x DCM, 3x DMF). Anschließend wurden 3 ml DMF/Piperidin (4:1) für 5 min dem Harz hinzugefügt. Die DMF/Piperidin-Behandlung wurde einmal wiederholt. Das Harz wurde gewaschen (5x DMF, 3x DCM, 3x DMF). Eine Kupplungsausbeute von 75% wurde durch Messung der Absorption der Abspaltungslösung wie oben beschrieben bestimmt. Eine 0.4 M Lösung von 3-Carboxypropansulfonamid (2.06 mmol, 344 mg), DIC (2.06 mmol, 259.97 µl) in DMF wurde zu dem Harz gegeben. Der Spritzenreaktor wurde 15 h vor dem Waschen (5x DMF, 10x DCM) geschüttelt. Das Harz wurde unter vermindertem Druck getrocknet, und die Ausbeute wurde mittels Bromphenolblau-Test bestimmt (96%, Endbeladungszustand: $b = 0.517 \text{ mmol/g}$). Anschließend wurden freien *N*-Termini durch die 5-minütige Behandlung mit $\text{Ac}_2\text{O}/2,4\text{-Lutidin}/\text{DMF}$ (5:6:89) blockiert.

Kupplung der ersten Aminosäure auf das Sulfonamid-Harz Harzes 47: Die Erstbeladung auf das Harz 47 wurde nach einem Protokoll von *Backes et al.* durchgeführt (3 Äq. Fmoc-AS-OH, 3 Äq. PyBOP, 5. Äq. DIEA in CHCl_3 , -20°C , 8h).^[91b]

Synthese von Peptidthioester mit Selbstreinigung: Das vorbeladene Harz wurde weiter mittels des Parallelsynthesizer *RS MultiPep* wie oben beschrieben (Automatisierte Festphasensynthese) behandelt. An diesem wurde das Peptid bis zur vorletzten Aminosäure aufgebaut. Nach der Fmoc-Entfernung der letzten gekuppelten Aminosäure, wurden 4 Äq. Fmoc-Lys(Biotin)-OH in DMF/NMP (1:1) mit einer Konzentration von 0.1 M und 1 h Reaktionszeit zweifach gekuppelt (Doppelkupplung). Das Harz wurde gewaschen (3x DMF, 3x DCM, 3x DMF) und blockiert. Nach der Fmoc-Abspaltung wurde eine 0.1 M Lösung des Mmt-geschützten Zyklisierungslinkers (48) in 5 vol.% Triethylamin/DMF zu dem Harz gegeben. Das Gemisch wurde 12 h geschüttelt und anschließend gewaschen (3x DMF, 3x DCM und 3x DMF). Nach der Acetylierung wurde das Harz 5x mit DMF und 10x mit DCM gewaschen. Nach dem Trocknen wurde das Harz 2-mal mit 500 µl DCM (1%TFA) behandelt. Die Kupplungsausbeute wurde photometrisch über die Mmt-Kationen-Absorption in der Abspaltlösung bestimmt ($\epsilon_{477} = 61'500 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Um eine vollständige Abspaltung zu garantieren, wurde zusätzlich mit 2 ml DCM (1% TFA, 1% Triisopropylsilan (TIS)) behandelt. Nach dem Waschen (10x DCM, 3x 1 %DIEA in DMF, 5x DMF) wurde das Harz zweimal 60 min mit einer Lösung von 8 Äq. PyBOP ($c = 0,2 \text{ M}$), 8 Äq. Oxyma und 12 Äq. DIEA in DMF behandelt. Nach dem Waschen (3x DMF, 3x DCM, 10x getrocknetes THF),

wurde 400 µl einer 1 M TMS-Diazomethan Lösung in n-Hexan/getrocknetes THF (1:1) zu dem Harz gegeben und die Mischung wurde für 90 min geschüttelt. Nach dem Waschen (3x DMF, 3x DCM, 3x DMF) wurde eine 1 M Lösung von 50 Äq. Benzylmercaptan und 3 Äq. Natriumthiophenolat (bezogen auf die Sulfonamid-Beladung) in DMF zu dem Harz gegeben. Die Mischung wurde min. 24 h geschüttelt. Danach wurde das Harz gewaschen (5x THF (1% TFA), 5x NMP/DMSO (3:1:1% TFA), 5x DMSO (1% TFA), 5x DCM / TFE (4:1:1% TFA). Der Waschvorgang wurde einmal wiederholt. Es wurde eine Testabspaltung (min 2 mg Harz; 96% TFA, 2% H₂O, 2% TIS) durchgeführt, um die Reinheit des Peptids zu bestimmen. War diese nicht ausreichend wurde der Waschvorgang wiederholt. Für die Thioester-Freisetzung wurde das Harz mit einer Lösung von 96% TFA, 2% H₂O und 2% TIS für 2 h bei Raumtemperatur behandelt. Falls sich der Phosphotyrosinbaustein **42** im Peptid befand wurde nach 2 h 10% H₂O zugegeben und die Abspaltungsmischung wurde in ein Plastikgefäß (15 ml) überführt. Die Abspaltungszeit wurde auf insgesamt 18 Stunden verlängert. Der Rohpeptidthioester wurde durch Zugabe von Diethylether ausgefällt. Nach Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das verbleibende Pellet wurde in H₂O/ACN/TFA gelöst (1:1:0,1%). Die Peptide wurden bei -25°C gelagert. Die Rohprodukte wurden durch HPLC oder UPLC-ESI-MS und MALDI-TOF-MS charakterisiert und ohne weitere Reinigung verwendet. Die Ausbeuten wurden bei 278 nm und pH 1 mittels optischer Dichte der Thioester Lösungen in H₂O/ACN/TFA (1:1:0,1%) bestimmt.

H-K^(Bt)SATPTAVALYNFAGEQPGDL-SBzl (54)

Das Peptid wurde im 10 µmol-Maßstab halb-automatisiert synthetisiert. Ausbeute: Abs.₂₇₈ = 0.206 (3 ml, 4.41 µmol, 44%, ε₂₇₈ = 1400 l · mol⁻¹ · cm⁻¹). HPLC: t_R = 18.5 min (Gradient: 3-80% B in 20 min). Reinheit_{HPLC278nm} = 94%. ESI-MS: 2482.28 m/z (dekonvoliert (dekonv.)), MALDI/ TOF-MS: 2486.3 m/z ([M+H]⁺), (C₂₀₄H₃₁₉N₅₉O₅₉S₂, berechnet Molekulargewicht (Mg): 2482.83 g · mol⁻¹).

H-K^(Bt)SATPTAVALYNFAGEQPGDLAFKKG-SBzl (59)

Das Peptid wurde im 10 µmol-Maßstab halb-automatisiert synthetisiert. Ausbeute: Abs.₂₇₈ = 0.098 (1 ml, 0.71 µmol, 7%, ε₂₇₈ = 1400 l · mol⁻¹ · cm⁻¹). HPLC: t_R = 15.5 min (Gradient: 3-80% B in 20 min). Reinheit_{HPLC278nm} = 83%. ESI-MS: 3014.40 m/z (dekonv.) MALDI/ TOF-MS: 3015.1 m/z ([M+H]⁺), (C₁₃₉H₂₀₉N₃₃O₃₈S₂, berechnet: 3014.47 g · mol⁻¹).

Da die restlichen Thioester des Cystein-Scans (**55-70**) der SH3-Domäne von YSC84 die nicht weiterverwendet wurden, sind sie hier nicht detailliert aufgeführt die Reinheiten und Ausbeuten können Tabelle 4.1 auf Seite 44 entnommen werden. Die gefundenen Massen im MALDI-TOF und der HPLC-MS-Spektren der Hauptpeaks stimmten mit den berechneten Massen überein.

H-K^(Bt)LYRAG-SBzl (**88**)

Das Peptid wurde im 5 µmol-Maßstab manuell synthetisiert. Ausbeute: Abs.₂₇₈ = 0.280 (3 ml, 2.01 µmol, 40%, ϵ_{278} = 1400 l · mol⁻¹ · cm⁻¹). HPLC: t_R = 11.0 min (Gradient: 3-80% B in 20 min). Reinheit_{HPLC278nm} = 82%. ESI-MS: 1039.50 m/z (dekonv.), (C₄₉H₇₄N₁₂O₉S₂, berechnet: 1039.32 g · mol⁻¹).

6.4.2 Synthese der His₆-Cysteinylopeptiden der Hefe-SH3-Domäne von YSC84

Die Cysteinylopeptide (**71-77**) wurden im 5-10 µmol-Maßstab am *MultiPep RS*-Peptidsyntheseautomaten nach der allgemeinen Vorschrift (6.3.2 Automatische Festphasen-Peptidsynthese, Seite 144) auf 25 mg Tentagel R Ram Harz (Beladung: 0.2 mmol/g) synthetisiert. Die finale Abspaltung erfolgte wie unter Abschnitt 6.3.1 angegeben. Es wurde nicht aufgereinigt. Die Rohpeptide wurden mittels HPLC-MS und MALDI/TOF analysiert.

H-CFKKGDVITILKKSDSQNDWWTGRTNGKEGIFPANYVRVS-H₆-NH₂ (**71**)

Das Peptid wurde im 10 µmol-Maßstab synthetisiert. Ausbeute: Abs.₂₇₈ = 0.682 (2.6 ml, 1.41 µmol, 14%, ϵ_{278} = 12'600 l · mol⁻¹ · cm⁻¹). HPLC: t_R = 10.2 min (Gradient: 3-90% B in 20 min). Reinheit_{HPLC278nm} = 98%. ESI-MS: 5381.93 m/z (dekonv.), MALDI/TOF-MS: 5383.3 m/z ([M+H]⁺), (C₂₄₀H₃₆₀N₇₆O₆₅S₁₁, berechnet: 5381.96 g · mol⁻¹).

H-CVITILKKSDSQNDWWTGRTNGKEGIFPANYVRVS-H₆-NH₂ (**73**)

Das Peptid wurde im 5 µmol-Maßstab synthetisiert. Ausbeute: Abs.₂₇₈ = 0.850 a.u. (2 ml, 1.35 µmol, 27%, ϵ_{278} = 12'600 l · mol⁻¹ · cm⁻¹). HPLC: t_R = 15.1 min (Gradient: 3-50% B in 20 min). Reinheit_{HPLC278nm} = 59%. ESI-MS: 4805.7 m/z (dekonv.), MALDI/TOF-MS: 4807.1 m/z ([M+H]⁺), (C₂₁₃H₃₁₉N₆₉O₅₈S₁, berechnet: 4806.30 g · mol⁻¹).

Da die restlichen Hexahistidin-markierten Cysteinylopeptide des Cystein-Scans der SH3-Domäne von YSC84 nicht weiterverwendet wurden, sind sie hier nicht detailliert aufgeführt. Die Reinheiten und Ausbeuten können der untenstehenden Tabelle 6.2 entnommen werden. Die gefundenen Massen im MALDI-TOF und der HPLC-MS-Spektren der Hauptpeaks stimmten mit den berechneten Massen überein.,

Tabelle 6.2: Übersicht über die synthetisierten Hexahistidin-markierten Cysteinylopeptide der YSC84 SH3-Domäne. Sequenzen sind in Abbildung 4.2 aufgeführt.

Nr. Mutante	Nr.	AS Länge	Rohausbeute ^[a]	Reinheit ^[b]	resultierende Ausbeute ^[c]
01	71	44	14.0%	98.0%	13.7%
02	72	43	31.0%	73.0%	22.6%
03	73	42	26.0%	71.0%	18.5%
04	74	41	34.0%	16.0%	5.4%
05	75	40	6.0%	33.0%	2.0%
06	76	39	27.0%	59.0%	15.9%
07	77	38	52.0%	47.0%	24.4%
08	78	37	50.0%	48.0%	24.0%
09	79	36	28.0%	64.0%	17.9%
10	80	35	24.0%	23.0%	5.5%
11	81	34	25.0%	14.0%	3.5%
12	82	33	29.0%	18.0%	5.2%
13	83	32	23.0%	25.0%	5.8%
14	84	31	28.0%	22.0%	6.2%
15	85	30	33.0%	26.0%	8.6%
16	86	29	16.0%	22.0%	3.5%
17	87	28	25.0%	14.0%	3.5%

[a] Ausbeuten wurden durch Absorption bei 278 nm bestimmt. [b] Reinheiten bestimmt mittels HPLC bei 278 nm. [c] Resultierende Ausbeuten wurde als Produkt der Rohausbeuten und der Reinheit berechnet.

H-CRAEYSK-H₆-NH₂ (89)

Das Peptid wurde im 6 µmol-Maßstab synthetisiert. Ausbeute: Abs.₂₇₈ = 0.482 (1.5 ml, 4.84 µmol, 81 %, ϵ_{278} = 1'400 l · mol⁻¹ · cm⁻¹). HPLC: t_R = 1.7 min (Gradient: 3-80% B in 20 min). Reinheit_{HPLC278nm} = 95%. ESI-MS: 1676.7 m/z (dekonv.), (C₇₁H₁₀₀N₃₀O₁₇S₁, berechnet: 1677.81 g · mol⁻¹).

6.4.3 Vorgehen zur Quantifizierung von immobilisierten Biotin-tragenden Peptiden mit HRP-SA Analyse

Eine Übersicht der verwendeten Puffer ist in Tabelle 6.1 auf Seite 142 zu finden. Das Vorgehen orientierte sich dabei an den Arbeiten von Franziska Mende.^[207]

Immobilisierung: Die zu immobilisierenden Hexahistidin-markierten Peptide (100 μ M) wurden im Immobilisierungspuffer gelöst und 100 μ l je Kavität in die Ni-NTA *HisGrab 8*-Mikrotiterstreifen (96er Format, Beladung: \sim 9 pmol) der Firma Pierce gegeben. Der Überstand wurde nach 30 Minuten entfernt. Anschließend wurde mit 200 μ l pro Kavität H_2O , 200 μ l Waschpuffer und 200 μ l H_2O gewaschen.

Rekrutierung von HRP-SA: Die zu analysierenden Kavitäten wurden jeweils mit 50 μ l einer Lösung des HRP-SA Konjugats (0.25 mg/l in Selektivitätspuffer) behandelt. Es wurde anschließend stark geschüttelt, so dass die Kavitäten bis zur 100 μ l Füllhöhe benetzt wurden. Nach 30-minütiger Inkubation wurde gewaschen (200 μ l H_2O , 200 μ l Waschpuffer 2, 200 μ l H_2O)

HRP-katalysierte TMB-Oxidation: Es wurden 50 μ l einer TMB-Wasserstoffperoxid Lösung (*1-Strep Ultra TMB ELISA* von *Pierce*) pro Kavität hinzugegeben. Eine Blaufärbung zeigte einen positiven Reaktionsverlauf an, bei Kavitäten die immobilisierte Biotin-tragende Peptide aufwiesen. Es wurde, wenn nicht anderes angegeben, genau 15 Minuten oxidiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 μ l einer 1 M Schwefelsäure augenblicklich gestoppt, worauf sich die blaue Lösung gelb färbte. Anschließend wurde möglichst schnell die Absorbanz der Lösungen bei 450 nm im Plattenleser bestimmt.

Alkylierung der Thiole der BSA-Beschichtung der Mikrotiterplatten

Es wurde eine durchsichtige BSA-beschichtete Ni-NTA-Platte zuerst 30 min mit einer 10 mM DTT-Lösung (200 μ l pro Kavität) behandelt. Nach fünfmaligen Waschen mit Wasser wurden in je 16 Kavitäten eine 1 M Lösung aus Alkylierungsreagenz (ICH_2CONH_2 oder ICH_2COOH bei pH 9) gegeben und die Platte wurde fünf Stunden bei 40°C geschüttelt. Anschließend wurde fünfmal mit Wasser gewaschen. Zu den 16 mit Iodessigsäure-behandelten Kavitäten und zu den 16 Iodacetamid-behandelten Kavitäten sowie zu 16 unbehandelten Kavitäten einer nicht BSA-beschichteten PS-Mikrotiterplatte, wurden je acht unterschiedliche Konzentrationen des Peptidthioesters (**88**) in Duplikaten gegeben. Nach 7 h Schütteln im Ligationspuffer, wurde der Überstand entfernt und es wurde zehnmal mit Wasser gewaschen. Die oben beschriebene HRP-SA Analyse zeigte die in Abbildung 4.4 B (Seite 46) dargestellten Absorptionen.

Ligationsexperimente auf Ni-NTA-Mikrotiterplatten

Die Hexahistidin-markierten Cysteinylopeptide (**71**, **73** oder **89**) wurden wie oben beschrieben auf den Ni-NTA Platten in Duplikaten immobilisiert. Nach dem Waschen

(200 μl H_2O , 200 μl Waschpuffer, 200 μl H_2O) wurde eine Lösung der Thioester (**54**, **59** oder **88**) zu den entsprechenden immobilisierten Cysteinylopeptiden im Ligationspuffer gegeben. Für die Reaktionen, die in Abbildung 4.4 A dargestellt sind, betrugen die Thioester-konzentrationen 5 μM . Für die NCL zu **90** in Abbildung 4.5 B wurde eine 100 μM Konzentration von Thioester **88** im Ligationspuffer mit BSA oder RBR verwendet. Die Ligation zwischen immobilisierten Cysteinylopeptid **71** und Thioester **54** in Abbildung 4.7 wurde ebenfalls mit 100 μM Konzentration an Thioester **54** durchgeführt.

Entschwefelungsexperimente auf Ni-NTA-Mikrotiterplatten

Für das in Abbildung 4.6 dargestellte Experiment wurde das Ligationsprodukt **90** auf Ni-NTA-Platten wie oben beschrieben in 12 Kavitäten immobilisiert nach dem Waschen (200 μl H_2O , 200 μl Waschpuffer, 200 μl H_2O) wurden die Kavitäten mit unterschiedlichen Konzentrationen an Entschwefelungsreagenzien für 5 Stunden bei 40°C versetzt (Angaben in Abbildung 4.6, Seite 50). Nach dem Waschen (200 μl H_2O , 200 μl Waschpuffer 2, 200 μl H_2O) wurde eine HRP-SA Bestimmung wie beschrieben durchgeführt. Anschließend wurden die Peptide durch Imidazol (0.2 M) bei pH 4 von der Oberfläche verdrängt und anschließend mittels nano-FT-ICR im Arbeitskreis Prof. *Michael Linscheid* vermessen. Analog wurde bei dem Experiment in Abbildung 4.7 verfahren. Die Reaktionszeit der Entschwefelung betrug dort aber 12 Stunden.

6.5 Experimentelle Vorschriften zu Unterkapitel 4.2

Die in diesem Kapitel beschriebenen Arbeiten wurden zusammen mit *Michael Krumrey* im Rahmen seiner Bachelorarbeit mit dem Titel: „*Synthese und Evaluation eines neuartigen Azidothiol-Linkers für die Immobilisierung von Proteindomänen auf Mikrotiter-Platten mittels Kupfer-katalysierter Azid-Alkin-Cycloaddition*“ durchgeführt.

6.5.1 Synthese des Azidothiol-Linkers **99**

2-(2-Azido-ethoxy)-ethanol (**96**)

Es wurden 2-(2-Chloro-ethoxy)-ethanol **95** (1.08 ml, 10.0 mmol) und Natriumazid (1.31 g, 20.0 mmol, 2 Äq.) in 10 ml Wasser bei 90°C 26 Stunden erhitzt. Die Reaktionslösung wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und mit DCM extrahiert (4x15 ml). Die organischen Phasen wurden gesammelt, mit Magnesiumsulfat getrocknet und abfiltriert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Es darf kein

Hochvakuum verwendet werden, der Dampfdruck der Verbindung ist zu hoch. Es wurde eine farblose Flüssigkeit erhalten. Ausbeute: 1.25 g, 9.5 mmol (95%); $R_f = 0.8$ (DCM:MeOH 4:1); Summenformel: $C_4H_9O_2N_3$ ($131.13 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$); HRMS (m/z): $[M+H]^+ = 132.0767$ (ber.: 132.0768)

^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3 , 25°C): $\delta[\text{ppm}] = 3.75$ (m, 2H, H_2COC); 3.69 (t, $^3J = 5.0$ Hz, 2H, H_2COC); 3.61 (t, $^3J = 4.7$ Hz, 2H, H_2COH); 3.40 (t, $^3J = 5.0$ Hz, 2H, H_2CN_3); 2.22 (s, 1H, OH);

^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3 , 25°C): $\delta[\text{ppm}] = 72.2$ (CH_2COH); 70.0 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$); 61.5 (CH_2OH); 50.4 (CH_2N_3).

S-Trityl-2-(2-azidoethoxy)ethyl-3-mercaptopropanoat (98)

Es wurden 2-(2-Azido-ethoxy)-ethanol (**96**) (0.500 g, 3.77 mmol), *S*-Trityl-Mercapto-Propionsäure **97** (Wurde im Arbeitskreis hergestellt) (1.477 g 4.15 mmol, 1.1 Äq.) und DMAP (47 mg, 0.38 mmol, 0.1 Äq.) in 38 ml THF gegeben und auf 0°C gekühlt. Zu der 0°C kalten Reaktionslösung wurde 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid Hydrochlorid (EDC*HCl) (0.876 g, 4.53 mmol, 1.2 Äq.) hinzugegeben und mit 20 ml DMF verdünnt. Die Reaktionslösung wurde eine Stunde bei 0°C und 16 h lang bei Raumtemperatur gerührt. Nach 16 h wurde durch die Dünnschichtchromatographie kein Reaktionsfortschritt festgestellt. Die Reaktionslösung wurde mit 60 ml DCM verdünnt und fünfmal mit jeweils 50 ml Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und abfiltriert. Unter vermindertem Druck wurde das Lösungsmittel entfernt und der zurückbleibende Feststoff in 20 ml DCM gelöst. Die Reaktionslösung wurde mit Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) (0.778 g, 3.77 mmol) und DMAP (47 mg, 0.38 mmol, 0.1 Äq.) versetzt und 90 Minuten lang gerührt. Das Ende der Reaktion wurde durch fehlenden Edukt-Spot bei der dünn-schichtchromatographischen Analyse identifiziert. Die Reaktionslösung wurde mit 50 ml DCM verdünnt und mit jeweils 40 ml einer gesättigten NaHCO_3 -Lösung, einer gesättigten NaCl-Lösung und Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und abfiltriert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das zurückbleibende farblose Öl wurde mittels Säulenchromatographie aufgereinigt (Cyclohexan:Ethylacetat 3:1). Als Produkt wurde ein farbloses Öl erhalten. Ausbeute: 1.47 g, 3.17 mmol (84%); $R_f = 0.5$ (Cy:EA 3:1); Summenformel: $C_{26}H_{27}O_3N_3S$ ($461.58 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$); HRMS (m/z): $[M+Na]^+$: 484.1663 (ber.: 484.1665)

^1H -NMR (500 MHz, Aceton- d_6 , 25°C): $\delta [\text{ppm}] = 7.45$ (m, 6H, Aryl-**H**); 7.35 (m, 6H, Aryl-**H**); 7.24 (m, 3H, Aryl-**H**); 4.17 (t, $^3J = 5.0$ Hz, 2H, $\text{H}_2\text{C-OC=O}$); 3.67 (m, 4H,

H₂COCH₂); 3.37 (t, $^3J = 5.0$ Hz, 2H, **H₂CN₃**); 2.45 (t, $^3J = 7.3$ Hz, 2H, **H₂CS**); 2.29 (t, $^3J = 7.3$ Hz, 2H, **H₂CCOOC**).

¹³C-NMR (125.1 MHz, Aceton-d₆, 25°C): δ [ppm] = 172.1 (**COO**); 145.9 (Aryl **C_{quat.}**); 130.5 (Aryl **CH**); 128.9 (Aryl **CH**); 127.7 (Aryl **CH**); 70.8 (**CH₂CH₂N₃**); 69.7 (**OCH₂CHO**); 67.6 (**SCPh₃**); 64.4 (**COOC**); 51.4 (**CH₂N₃**); 34.0 (**CH₂COO**); 27.8 (**CH₂S**).

2-(2-Azidoethoxy)ethyl-3-mercaptopropanoat (99)

In einem Schlenkkolben wurden unter Argonatmosphäre *S*-Trityl-2-(2-azidoethoxy)ethyl-3-mercaptopropanoat **98** (0.650 g, 1.39 mmol) und Quecksilberacetat (1.367 g, 4.17 mmol, 3 Äq.) in 40 ml Acetonitril gegeben und 14 h lang gerührt. Nach dem vollständigen Umsatz des Edukts wurde der Reaktionslösung portionsweise Natriumborhydrid (0.187 g, 4.87 mmol, 3.5 Äq.) zugesetzt. Es wurde eine Gasentwicklung und die Ausbildung eines grauen Feststoffes beobachtet. Nach Beendigung der Gasentwicklung wurde die Reaktionslösung mit 2 M HCl-Lösung versetzt, wobei erneut Gas entstand. Nach Abklingen der Gasentwicklung, wurde die Reaktionslösung mit 75 ml Ethylacetat verdünnt. Die Lösung wurde mit 20 ml 1 M HCl, 20 ml gesättigter NaCl-Lösung und 20 ml Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und abfiltriert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und ein Rohproduktgemisch aus weißem Feststoff und gelbbraunem Öl erhalten. Das Gemisch wurde mittels Säulenchromatographie aufgereinigt (Cyclohexan:Ethylacetat 3:1). Als Produkt wurde ein gelbbraunes Öl erhalten. Ausbeute: 115 mg, 0.53 mmol (98% Ausbeute); $R_f = 0.25$ (Cy:EA 3:1); Summenformel: C₇H₁₃O₃N₃S (219.26 g · mol⁻¹); HRMS (m/z): $[M+H]^+ = 220.0751$ (ber.: 220.0750);

¹H-NMR (500 MHz, Aceton-d₆, 25°C): δ [ppm] = 4.24 (t, $^3J = 5.0$ Hz, 2H, **H₂C-OC=O**); 3.72 (m, 4H, **H₂COCH₂**); 3.40 (t, $^3J = 5.0$ Hz, 2H, **H₂CN₃**); 2.75 (m, 2H, **H₂CS**); 2.67 (m, 2H, **H₂CCOOC**); 1.96 (t, 1H, **SH**);

¹³C-NMR (125.1 MHz, Aceton-d₆, 25°C): δ [ppm] = 172.1 (**C=OO**); 70.8 (**CCH₂N₃**); 69.7 (**COCCO**); 64.3 (**C=OOC**); 51.4 (**CN₃**); 39.2 (**CCOO**); 20.2 (**CS**).

Nach 2 Monaten Lagerung im Kühlschrank bei 8°C wurde das in Abbildung 6.1 gezeigte Massenspektrum mit der HPLC-MS als Hauptkomponente erhalten. Ebenso wurde ein ¹H-NMR-Spektrum von dieser Verbindung gemessen, welches in Abbildung 10.1 auf Seite 225 dargestellt. Die Masse wurden ebenfalls hochaufgelöst bestätigt. HRMS (m/z): $[M+H]^+ = 411.1366$ (ber.: 411.1367 nach C₁₄H₂₇N₄O₆S₂).

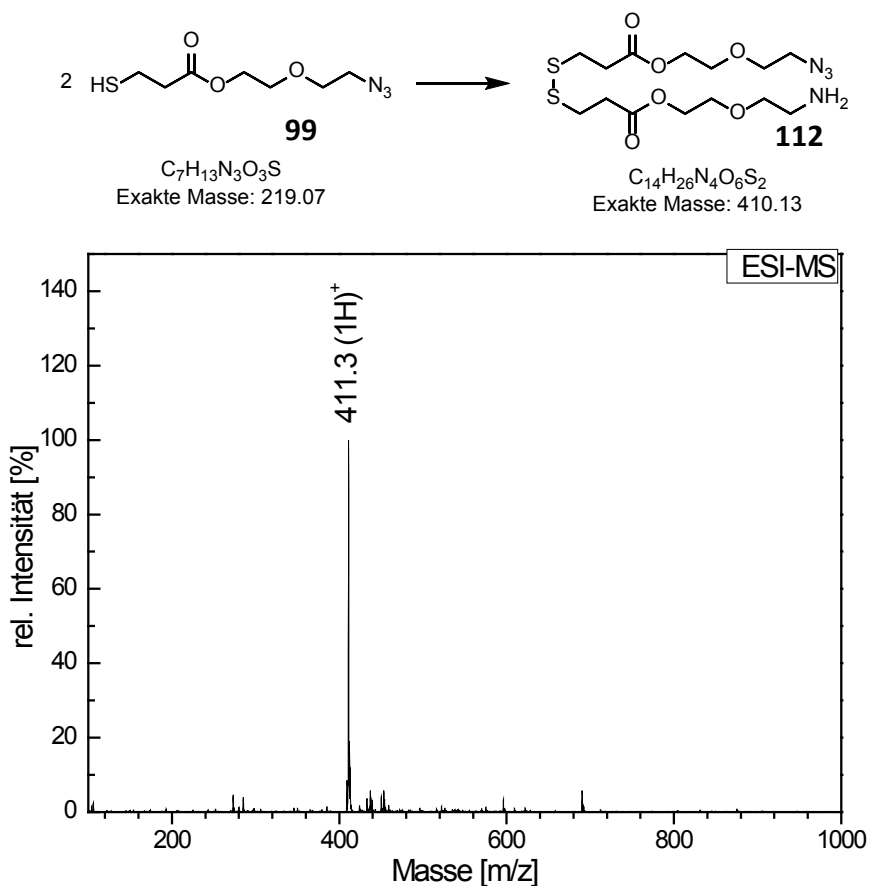


Abbildung 6.1 HPLC-MS-Massenspektrum nach der 2-monatiger Lagerung des Azidothiol-Linkers **99** (unten). So wie vermutete Reaktion zu den Disulfid **112** (oben)

Synthese der benötigten Peptide

K^(Bt)LYRAGARAEYSKC-NH₂ (102)

Das Peptid wurde im 5 μmol -Maßstab automatisiert synthetisiert (Abschnitt 6.3.2, Seite 144). Die Aufreinigung erfolgte mittels semipräparativer Umkehrphasen-HPLC (RP-HPLC), Gradient: 03-80% B in 30 min. Ausbeute: $\text{Abs}_{278} = 0.588$ (1 ml, 2.1 μmol , 22%, $\epsilon_{278} = 2'800 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). HPLC: $t_R = 9.5 \text{ min}$ (Gradient: 3-90% B in 20 min). Reinheit_{HPLC278nm} = 92%. ESI-MS: 1840.94 m/z (dekonv.), MALDI/TOF-MS: 1842.4 m/z ($[\text{M}+\text{H}]^+$), ($\text{C}_{80}\text{H}_{190}\text{N}_{25}\text{O}_{21}\text{S}_2$, berechnet: 1841.17 $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$).

K^(Bt)LYRAGCRAEYSK-Pra-NH₂ (101)

Das Peptid wurde teilweise manuell im 5 μmol -Ansatz nach der allgemeinen Synthesevorschrift (Abschnitt 6.3.1, Seite 143) auf 28 mg Tentagel R Ram Harz syntheti-

siert. Der Sequenzabschnitt LYRAG wurden nach dem automatisierten Protokoll aufgebaut. Die Aufreinigung erfolgte mittels semipräparativer Umkehrphasen-HPLC (RP-HPLC), Gradient: 03-80% B in 30 min. Ausbeute: Abs.₂₇₈ = 0.17 (1 ml, 0.61 µmol, 12%, ϵ_{278} = 1'400 l · mol⁻¹ · cm⁻¹). HPLC: t_R = 9.6 min (Gradient: 3-90% B in 20 min). Reinheit_{HPLC278nm} = 90%. ESI-MS: 1865.94 m/z (dekonv.), MALDI/TOF-MS: 1865.9 m/z ([M+H]⁺), (C₈₂H₁₃₀N₂₅O₂₁S₂, berechnet: 1864.91 g · mol⁻¹).

H-CEAAAEAYV-Pra-NH₂ (106)

Das Peptid wurde manuell im 10 µmol-Ansatz nach der allgemeinen Synthesevorschrift aus Abschnitt 6.3.1 (Seite 143) auf 55 mg Tentagel R Ram Harz synthetisiert. Die Aufreinigung erfolgte mittels semipräparativer Umkehrphasen-HPLC, Gradient: 03-80% B in 30 min. Ausbeute: Abs.₂₇₈ = 0.070 (2 ml, 1.0 µmol, 10%, ϵ_{278} = 1'400 l · mol⁻¹ · cm⁻¹). HPLC: t_R = 9.5 min (Gradient: 3-90% B in 20 min). Reinheit_{HPLC278nm} = 98%. ESI-MS: 1018.95 m/z, MALDI/TOF-MS: 1020.4 m/z ([M+H]⁺), (C₄₄H₆₅N₁₁O₁₅S₁, berechnet: 1019.40 g · mol⁻¹).

H-CFKKGDVITILKKSDSQNDWWTGRTNGKEGIFPANYVRVS-Pra-NH₂ (109)

Das Peptid wurde halb-automatisiert im 10 µmol-Ansatz nach der allgemeinen Synthesevorschrift aus Abschnitt 6.3.1 (Seite 143) auf 26 mg Tentagel R Ram Harz synthetisiert. Die erste Aminosäure (Pra) wurde manuell nach Standardbedingungen gekuppelt. Die Aufreinigung erfolgte nach einem Fmoc-on/Fmoc-off Mechanismus. Das Fmoc-geschützte Peptid wurde mittels semipräparativer HPLC gereinigt. Gradient: 03-80% B in 30 min. Nach dem Gefriertrocknen wurde das Peptid in 1 ml DMF gelöst und die Fmoc-Schutzgruppe wurde durch langsames Zutropfen von Piperidin bei 0°C bis zu 20 vol.% entfernt. Zweimaliges Fällern in Et₂O lieferte das gereinigte gewünschte Produkt. Ausbeute: Abs.₂₇₈ = 0.201 (2 ml, 0.34 µmol, 7%, ϵ_{278} = 12'600 l · mol⁻¹ · cm⁻¹). HPLC: t_R = 10.5 min (Gradient: 3-90% B in 20 min). Reinheit_{HPLC278nm} = 90%. ESI-MS: 4653.78 m/z (dekonv.), MALDI/TOF-MS: 4658.0 m/z ([M+H]⁺), (C₂₀₉H₃₂₃N₅₉O₆₀S₁, berechnet: 4658.0 g · mol⁻¹).

6.5.2 HRP-SA-Kalibrierung mit Maleimid-funktionalisierten Platten.

Zur Quantifizierung der Ergebnisse des HRP-SA-Assays auf Maleimid-funktionalisierten Platten, wurden diese Platten der Firma *Pierce* mit unterschiedlichen Konzentrationen von K^(Bt)LYRAGARAEYSKC-NH₂ (**102**) kalibriert. Die Maleimid-modifizierte Platte wurde dreimal mit Wasser, dreimal mit Waschpuffer und fünfmal mit Wasser

gewaschen (jeweils 200 μl Lösung pro Kavität). In die Mikrotiterplatte wurden verschiedene Stoffmengen des Peptids **102** in jeweils 50 μl Additionspuffer gegeben und eine Stunde lang geschüttelt. Die Platte wurde dreimal mit Wasser, dreimal mit Waschpuffer und dreimal mit Wasser gewaschen. Die behandelten Kavitäten wurden jeweils mit 100 μl Blockierungspuffer versetzt und eine Stunde lang geschüttelt. Anschließend wurde die gebundenen biotinylierten Peptide mittels HRP-SA Analyse wie beschrieben quantifiziert (Abschnitt 6.4.3, Seite 148). Dabei wurden die Messpunkte erhalten, die in Abbildung 4.8 A zu sehen sind. Die Messpunkte im linearen Bereich wurden für eine lineare Regression verwendet mit der die Gl. 1 erhalten wurde.

CuAAC-Immobilisierung auf Azid-modifizierte Mikrotiterplatten

Die Addition des Azidothiol-Linkers **99** wurde in Additionspuffer 1 bzw. 2 durchgeführt (der in Abschnitt 4.2.1 erwähnte Vergleich der Additionspuffer zwischen TCEP- und NaBH_4 -Puffer, war zwischen Additionspuffer 1 und einem Puffer indem sich 20 mM NaBH_4 statt TCEP befand). Es wurden 50 μl einer 23 mM Lösung des Linkers **99** in die Kavitäten gegeben und eine Stunde lang geschüttelt. Die Kavitäten wurden gewaschen. Die Kavitäten wurden mit jeweils 100 μl Blockierungspuffer versetzt und die Platte eine Stunde lang geschüttelt. Die Kavitäten wurden gewaschen. Für die CuAAC-Reaktion wurde das Peptid **101** 30 Minuten bei Raumtemperatur in zwei verschiedenen Puffer (HEPES und Phosphat CuAAC-Puffer) in die Platten gegeben (Abbildung 4.8 C+D). Dafür wurden 50 μl einer 100 μM Lösung des Peptids **101** in die Kavitäten gegeben und 12 Stunden lang geschüttelt. Es wurden auch Kavitäten mit dem Peptid **101** versetzt, die vorher nicht mit Linker behandelt wurden. In der Folge wurde das Protokoll für den HRP-SA-Assay (Abschnitt 6.4.3, Seite 148) durchgeführt.

Untersuchung der Abhängigkeit der simultanen NCL-CuAAC von der Kupferkonzentration auf Azid-modifizierten Mikrotiterplatten

Alle 16 Kavitäten wurden wie oben beschrieben über einen Zeitraum von drei Stunden mit Azidothiol-Linker **99** modifiziert und über einen Zeitraum von zwei Stunden mit 100 μl Blockierungspuffer versetzt. Das *C*-Alkin-Cysteinylopeptid **106** (100 μM) und 300 μM von des Thioesters **88** in 50 μl HEPES-CuAAC-Puffer sowie den in Abbildung 6.2 angegebenen Konzentration an Kupfersulfat und jeweils doppelte Konzentration an THPTA wurden für die NCL-CuAAC-Reaktion verwendet. Die Reaktionslösungen wurden 12 Stunden lang geschüttelt. Nach anschließendem Waschen (5x 200 μl H_2O) wurde der HRP-SA-Assay zur Stoffmengenbestimmung (Abschnitt 6.4.3, Seite 148) mit Gl. 1 durchgeführt.

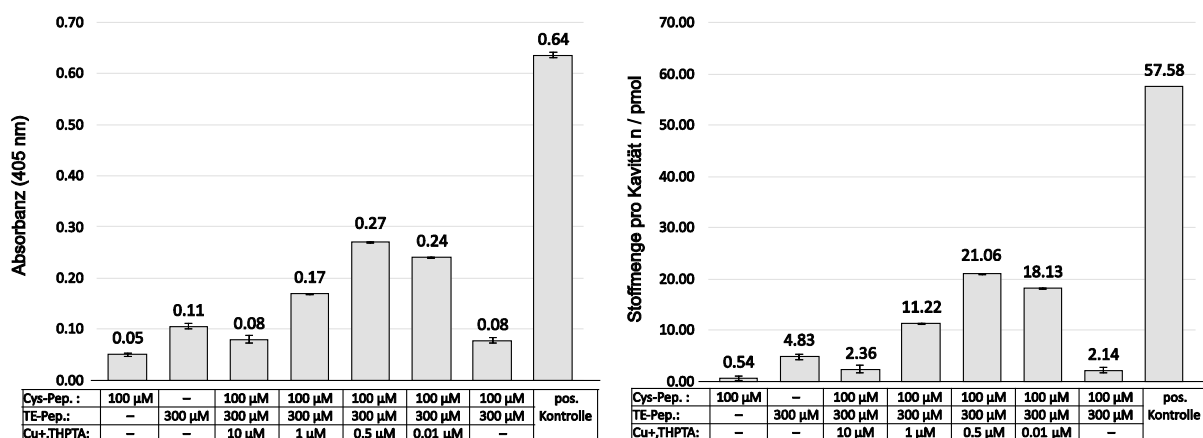


Abbildung 6.2 Untersuchung der Abhängigkeit der simultanen NCL-CuAAC von der Kupferkonzentration auf Azid-modifizierten Mikrotiterplatten, bei der Reaktion von Thioester **88** mit C-Alkin-Cysteinylopeptid **106** auf einer Azido-funktionalisierten Platte **100**. Pos. Kontrolle = positive Kontrolle durch CuAAC-Immobilisierung des Peptids **101** (100 µM). HRP-SA-Analyse (links), berechnete Stoffmengen mit Gl. 1 (rechts)

CuAAC-Immobilisierung, Oberflächenligation und -entschwefelung

Reaktionsfolgen auf der Oberfläche, welche eine CuAAC-Immobilisierung, Oberflächenligation und -entschwefelung beinhalteten, wie beispielsweise in Abbildung 4.9 (Seite 56) dargestellt, wurden wie folgt durchgeführt. Alle Kavitäten wurden mit 50 µl einer 36 mM-Lösung des Linkers **99** im Additionsbuffer versetzt und eine Stunde lang geschüttelt. Alle Kavitäten wurden mit 100 µl Blockierungspuffer 2 versetzt und eine Stunde lang geschüttelt. In die Kavitäten wurde 100 µl einer 100 µM-Lösung von Cysteinylopeptid **106** und Thioester **88** in HEPEC-CuAAC Puffer (0.5 µM CuSO₄, 1 µM THPTA, 1 mM TCEP, 1.5 mg/ml RBR, pH 8) wurden in die jeweiligen Kavitäten gegeben und 18 Stunden lang geschüttelt. Nach anschließendem Waschen (5x200 µl H₂O) wurde der HRP-SA-Assay zur Stoffmengenbestimmung mit Gl. 1 durchgeführt. Darauf folgend wurde die Entschwefelung mit dem Entschwefelungspuffer für 16 Stunden bei 40 °C durchgeführt. Nachdem Waschen (5x 200 µl H₂O) wurde die Stoffmenge erneut über HRP-SA Analyse (Abschnitt 6.4.3, Seite 148) bestimmt.

Das oben beschriebene Verfahren wurde ebenfalls für die Reaktion zwischen dem Cysteinylopeptid **109** (100 µM in 12 Kavitäten), dem Thioester **54** (200 µM) und der Platte **100** zu dem immobilisierten Produkt **110** angewendet (NCL, 14 h). (Abbildung 4.10, Seite 57)

Regenerierung der Azido-Funktionen durch Verbindung **113**

Es wurden neun Kavitäten mit dem Linker **99** wie oben beschrieben behandelt. Anschließend wurden zwölf Kavitäten mit Blockierungspuffer (1 h) und HEPES-Click-Puffer (14 h) vorbehandelt. Anschließend wurden neun Kavitäten (drei Kavitäten mit Linker wurden nicht behandelt) 100 µl des Puffers zur Generierung der Azido-Funktion

(30 mM Azido-Sulfat **113**, 50 mM NaHCO₃, 0.25 mM CuSO₄ in H₂O/MeOH(20%)) versehen und für 12 Stunden geschüttelt. Anschließend wurden die Kavitäten mit den oben beschriebenen Bedingungen mit Peptid **101** im HEPES-CuAAC Puffer behandelt (16 h). Nach dem Waschen (5x 200 µl H₂O) wurde die Absorbanz und Stoffmenge (Gl. 1) über die HRP-SA-Analyse (Abschnitt 6.4.3, Seite 148) bestimmt (Abbildung 6.3).

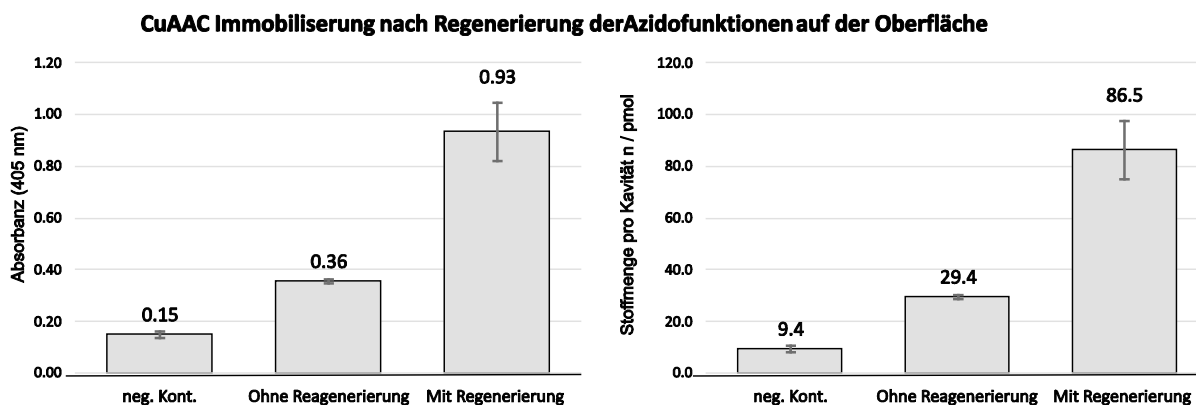


Abbildung 6.3 Untersuchung der Regenerierung von vermutlich reduzierten Azido-Funktionen auf der Oberfläche. Drei Kavitäten wurden mit Azid **113** reaktiviert und schließlich wurden alle Kavitäten mit dem Peptid **101** im HEPES-CuAAC Puffer behandelt. Durchführung in jeweils drei Kavitäten. neg. Kont. = negative Kontrolle, in diesen Kavitäten wurde kein Azidothiol-Linker hinzugefügt.

6.6 Experimentelle Vorschriften zu Unterkapitel 4.3

6.6.1 Synthese von Peptidhydraziden

Peptidhydrazide wurden auf Hydrazin-modifizierten Trityl-Harz ausgehend von Chlorotrityl- oder 2-Chlorotrityl-Harz aufgebaut. Das Chlortritylharz wurde nach einer Methode nach *Zheng et al.*^[100] in das Hydrazin-Trityl-Harz umgewandelt. Zu 200 mg des Chortritylharzes wurden 2 ml einer Mischung aus DMF/NEt₃/N₂H₄*H₂O (79:11:10) gegeben und für 1 h geschüttelt. Anschließend wurde das Harz mit DIEA(1%) in MeOH für 10 min behandelt, dreimal mit dieser Lösung und zehnmal mit MeOH gewaschen. Die erste Aminosäure wurde manuell mit HOBt als Additiv gekuppelt. Peptide mit einem C-terminalen Asparagin-Rest wurden mit einem C-terminalen β-Alanin-Rest als Abstandhalter synthetisiert, um Zyklisierungs-Nebenprodukte zu vermeiden. Der weitere Peptidaufbau wurde wie beschrieben durchgeführt (Abschnitt 6.3.1 und 6.3.2, Seite 143). Für die Synthese der SH3-Domänen auf der Oberfläche wurden die Cysteiny- und Penicillamin-Peptide in ungereinigter Form verwendet.

H-CGLYGAEGGG-N₂H₃ (116)

Das Peptid wurde im 10 µmol-Maßstab automatisiert synthetisiert (Abschnitt 6.3.2, Seite 144). Die Aufreinigung erfolgte mittels semipräparativer-HPLC, Gradient: 03-50% B in 30 min. Ausbeute: Abs.₂₇₈ = 0.720 (0.7 ml, 3.6 µmol, 39%, ϵ_{278} = 1'400 l · mol⁻¹ · cm⁻¹). UPLC: t_R = 2.08 min (Gradient: 3-60% B in 4 min). Reinheit_{UPLC278nm} = 95%. ESI-MS: 839.4 m/z (dekonv.), (C₈₀H₁₉₀N₂₅O₂₁S₂, berechnet: 839.91 g · mol⁻¹).

K^(Bt)GLYGEGGG-N₂H₃ (153)

Das Peptid wurde im 10 µmol-Maßstab automatisiert synthetisiert (Abschnitt 6.3.2, Seite 144). Das Peptid wurde ohne HPLC-Reinigung verwendet. Ausbeute: Abs.₂₇₈ = 0.675 (2 ml, 9.64 µmol, 96%, ϵ_{278} = 1'400 l · mol⁻¹ · cm⁻¹). HPLC: t_R = 10.8 min (Gradient: 3-60% B in 4 min). Reinheit_{HPLC278nm} = 90%. ESI-MS: 1077.30 m/z (dekonv.), MALDI/ TOF-MS: 1077.4 m/z ([M+H]⁺), (C₈₀H₁₉₀N₂₅O₂₁S₂, berechnet: 1077.21 g · mol⁻¹).

H-CFKKGDVITILKKSDSQNDWWTGRTNGKEGIFPANYVRVS-N₂H₃ (144)

Das Peptid wurde im 5 µmol-Maßstab automatisiert synthetisiert (Abschnitt 6.3.2, Seite 144). Die erste Aminosäure wurde manuell gekuppelt. Das Peptid wurde ohne Aufreinigung verwendet. Ausbeute: Abs.₂₇₈ = 0.820 (3 ml, 1.95 µmol, 39%, ϵ_{278} = 12'600 l · mol⁻¹ · cm⁻¹). HPLC: t_R = 11.0 min (Gradient: 3-90% B in 20 min). Reinheit_{UPLC278nm} = 92%. ESI-MS: 4573.80 m/z (dekonv.), MALDI/ TOF-MS: 4575.4 m/z ([M+H]⁺), (C₂₀₄H₃₁₉N₅₉O₅₉S, berechnet: 4574.14 g · mol⁻¹).

H-Pen-DDDWWLGELEKDGSKGLFPSNYVSLGNBAIa-N₂H₃ (147)

Das Peptid wurde im 10 µmol-Maßstab automatisiert synthetisiert (Abschnitt 6.3.2, Seite 144). Die erste und letzte Aminosäure (Fmoc-Pen(Trt)-OH) wurde manuell gekuppelt. Das Peptid wurde ohne Aufreinigung verwendet. Ausbeute: Abs.₂₇₈ = 0.721 (10 ml, 5.72 µmol, 5.72%, ϵ_{278} = 12'600 l · mol⁻¹ · cm⁻¹). UPLC: t_R = 2.31 min (Gradient: 3-90% B in 4 min). Reinheit_{UPLC278nm} = 48%. ESI-MS: 3258.28 m/z (dekonv.), MALDI/ TOF-MS: 3258.3 m/z ([M+H]⁺) (C₁₄₅H₂₁₃N₃₇O₄₇S, berechnet: 3258.53 g · mol⁻¹).

H-K^(Bt) KKENPWATAEYDYDAAEDNELTFVENDKIINIEF-SBzl (146)

Das Peptid wurde im 10 µmol-Maßstab nach dem Selbstreinigungs-Protokoll im Abschnitt 6.4.1 automatisiert synthetisiert (Abschnitt 6.3.2, Seite 144). Das Peptid wurde ohne Aufreinigung verwendet. Ausbeute: Abs.₂₇₈ = 0.223 (3 ml, 0.80 µmol, 8.0%,

$\varepsilon_{278} = 8'400 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). UPLC: $t_R = 2.85 \text{ min}$ (Gradient: 3-90% B in 4 min). Reinheit_{UPLC278nm} = 48%. ESI-MS: 4368.46 m/z (dekonv.), MALDI/ TOF-MS: 4371.0 m/z ($[\text{M}+\text{H}]^+$) ($\text{C}_{204}\text{H}_{319}\text{N}_{59}\text{O}_{59}\text{S}$, berechnet: 4368.76 g · mol⁻¹).

6.6.2 Analyse der Chemoselektivität der Hydrazonligation mit *N*-Cysteinylhydraziden

H-CGLYGAEGGG-N₂H₂-(CH₂)₃CH₃ (**121**)

Um die Chemoselektivität der Hydrazonknüpfung zu testen, wurde das Cysteinylpeptidhydrazid **116** (1 mM) mit zwei Äquivalenten Valeraldehyd **117** (2 mM) in 100 µl Konjugationspuffer zur Reaktion gebracht (0.1 M NH₄OAc, pH 4). Die Produktverteilung wurde mittels UPLC-MS analysiert (Abbildung 4.11 B, Seite 60). Nach 20 min war das Gleichgewicht bei 40 % des Produktes erreicht. Anschließend wurde die Lösung mit NaCNBH₃ als Feststoff versetzt, so dass die Konzentration 5 mM entspricht und es wurde die Produktverteilung erneut mittels UPLC-MS analysiert. Nach 1 h war das Hydrazon **119** vollständig zum *N*-Alkylhydrazid reduziert, zusätzlich verschob sich das Gleichgewicht zu einer finalen Ausbeute des gewünschten Produkts **121** von 70%.

H-CGLYGAEGGG-N₂H₂-CH₂CH(CH₃)₂ (**229**)

Um zu testen, ob eine höhere Ausbeute erreicht werden kann, wurde das Cysteinylpeptidhydrazid **116** (1 mM) mit 10 Äquivalenten Isobutyraldehyd **225** (10 mM) in 100 µl zur Reaktion gebracht (0.1 M NH₄OAc, pH 4). Die Produktverteilung wurde mittels UPLC-MS analysiert (Abbildung 6.4). Nach 68 min war das Gleichgewicht bei 85 % des Produktes **227** erreicht. Anschließende Zugabe von NaCNBH₃ (5 mM) reduzierte das Hydrazon **227** zu dem *N*-Alkylhydrazid **229**. Die Produktverteilung nach 1 Stunde NaCNBH₃-Behandlung zeigte ebenfalls 85% des Produktes **229**. Im Gegensatz zu der Behandlung mit Valeraldehyd wurde bei dieser Synthese 2% des Thiazolidin-Nebenproduktes **230** nach der Reduktion festgestellt. Vor der Zugabe von NaCNBH₃ wurde aber weder das Thiazolidin-Peptid **226** noch das Thiazolidin-Hydrazon **228** beobachtet.

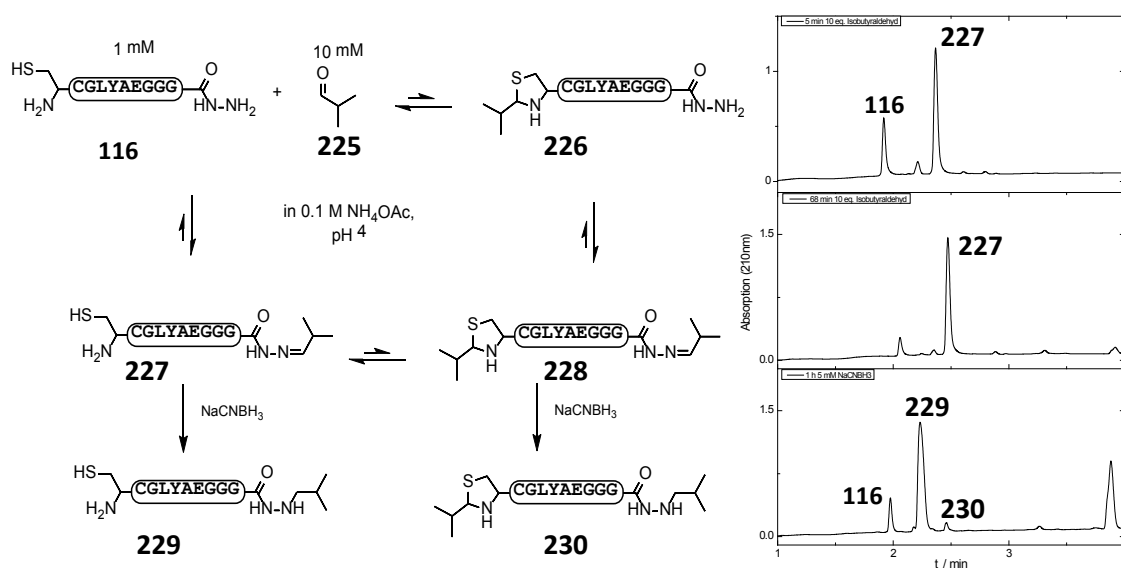


Abbildung 6.4 A: Reaktion von *N*-Cysteinyldipeptidhydrazid **116** mit zehn Äquivalenten Isobutyraldehyd **225** im Ammoniumchloridpuffer pH 4. Es sind mögliche Produkte in ihrem erwarteten Gleichgewicht aufgeführt. **B:** UPLC-MS Chromatogramme nach unterschiedlichen Zeiten mit an Hand ihrer Massen zugeordneten Verbindungen.

6.6.3 Untersuchung zur Reversibilität der Hydrazonbindung

Das *N*-Cysteinyldipeptidhydrazid **116** (143 nmol) wurde in 100 µl Konjugationspuffer gelöst. Anschließend wurden 30 mg Aldehyd-modifizierte Sepharosekugeln hinzugegeben und das Zweiphasensystem wurde 30 Minuten geschüttelt. Die Aldehyd-modifizierten Agarosekugeln wurden nach einem Protokoll von *Guisan* aus 4B Sepharose hergestellt.^[219] Im Überstand des Agarosegels konnte nach 30 Minuten durch UPLC-MS-Analyse (Abbildung 4.12 A, Seite 62), in dem angeschlossenen Massenspektrometer konnte keine Peptidmasse ($MH^+ = 840.4$ m/z, entspricht **116**) gefunden werden. Nach Waschen mit Wasser sowie etwas Ethanol und Acetonitril wurden 0.5 vol.% Hydrazinhydrat und 20 mM TCEP in Wasser zu dem peptidbeladenen Agarosegel gegeben und in bestimmten Intervallen die Absorption des Überstand mittels Nano-Drop-Spektrometer bei 278 nm analysiert. Die Datenpunkte wurden mit OriginPro 8.0 dargestellt und es wurde eine Regression nach der Hill-Gleichung durchgeführt (Abbildung 4.12 B, Seite 62).

6.6.4 Synthese des Mercapto-polyethylenglycol-acetal-Linkers (**141**)

Ein Syntheseüberblick ist dem Schema 4.7 auf Seite 65 zu entnehmen.

Oligoethylenglykol-dimethansulfonat (**139**)

Zu 9.29 ml Methansulfonylchlorid (120 mmol, 12 Äq.) in 100 ml Tetrahydrofuran wurde bei 0 °C 16.64 ml NEt₃ (129 mmol, 12 Äq.) und 10.2 g (10 mmol) PEG-1000

gegeben. Die Reaktionsmischung wurde zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt bevor gesättigte NH_4Cl -Lösung (100 ml) zugegeben wurde. Das Produkt wurde dreimal mit Chloroform extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit MgSO_4 getrocknet. Nach dem Entfernen des Chloroforms unter reduzierten Druck wurde das Produkt als braunes Öl erhalten. Anschließende Reinigung durch Säulenchromatographie auf Kieselgel (DCM/MeOH, 95: 5) lieferte das Produkt **139** als oranges Öl. Ausbeute: 11.70 g, 9.85 mmol (98%); $R_f = 0.48$ (DCM/MeOH, 95:5); Summenformel ($n = 20$): $\text{C}_{44}\text{H}_{90}\text{O}_{26}\text{S}_2$ (1099.30 $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$); HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+ = 1099.5240$ (ber.: 1099.5235);

^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3 , 25°C): $\delta[\text{ppm}] = 4.27$ (m, 4H, CH_2OSO_2), 3.65 (s/m, 4H, $(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n\text{CH}_2$), 3.53 (s, $J = 2.4$ Hz, 86H, $\text{O}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n$), 2.98 (s, 6H, SO_3CH_3);

^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3 , 25°C): $\delta[\text{ppm}] = 70.39$ ($\text{O}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n$); 69.22 (CH_2); 68.79 (CH_2); 37.49 (SO_3CH_3).

Oligoethylenglykol-disulfid (**140**)

Das Disulfonat (**139**) (10.9 g, 9 mmol) wurde in 160 ml trockenem THF gelöst und es wurden 3.27 g (19.80 mmol, 2.2 Äq.) Kalium-ethyldithiocarbonat zugegeben. Die resultierende Mischung wurde 16 h gerührt. Danach zeigte die dünnschichtchromatographische Analyse vollständigen Umsatz zu einem *O,S*-Dialkyl-dithiokohlensäureester Intermediat ($R_f = 0.35$ (DCM / MeOH, 95: 5)). Anschließend wurden bei 0°C über 10 min 36 ml Piperidin (360 mmol, 40 Äq.) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde sechs Stunden lang gerührt. Danach wurde 100 ml gesättigte NH_4Cl -Lösung zugesetzt und das gewünschte Produkt wurde dreimal mit je 150 ml CHCl_3 extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurde mit MgSO_4 getrocknet. Verdampfen der organischen Lösungsmittel unter vermindertem Druck und Reinigung durch Säulenchromatographie über Kieselgel (DCM/MeOH, 95:5) lieferte das gewünschte cyclische Produkt als blasen orangefarbenen Feststoff. Ausbeute: 9.5 g, 8.9 mmol (99%); $R_f = 0.50$ (DCM/MeOH, 95:5); Summenformel ($n = 20$): $\text{C}_{42}\text{H}_{84}\text{O}_{20}\text{S}_2$ (973.23 $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$); HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+ = 973.5098$ (ber.: 973.5081);

^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3 , 25°C): $\delta[\text{ppm}] = 3.71$ (t, $J = 6.7$ Hz, 4H, $\text{CH}_2\text{O}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n$), 3.63 (s/m, 96H), 2.87 (t, $J = 6.7$ Hz, 4H, CH_2S).

^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3 , 25°C): $\delta[\text{ppm}] = 72.99$ (CH_2); 70.66-70.49 ($\text{O}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n$), 69.74 (CH_2); 50.4 (CH_2S).

Diethoxyethylthio-oligoethylenoxy-ethyl mercaptan (141)

Natriumborhydrid (0.61 g, 16.00 mmol, 4 Äq.) wurde in 10 ml Acetonitril zu einer Lösung von 4.41 g (4 mmol) Verbindung zugesetzt. Diese Suspension wurde 30 min gerührt bis die stattfindende Gasentwicklung beendet war. Anschließend wurden 50 ml Ethanol und 139 mg Natrium (6 mmol, 1.5 Äq.) bei Raumtemperatur zugegeben. Nachdem das Natrium gelöst war, wurde das Reaktionsgemisch bis zum Rückfluss erhitzt und 0.84 ml Bromacetaldehyddiethylacetal wurde in 20 ml EtOH tropfenweise über 30 min hinzugegeben (5.6 mmol, 1.4 Äq.). Anschließend wurde die Lösung für 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach zeigte die dünnschichtchromatographische Analyse vollständigen Umsatz von **140**. Es wurde 140 ml gesättigte NH_4Cl -Lösung zugegeben und das gewünschte Produkt wurde dreimal mit je 150 ml CHCl_3 extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und über MgSO_4 getrocknet. Lösungsmittel wurden unter vermindertem Druck entfernt. Reinigung durch Säulenchromatographie über Kieselgel (DCM/MeOH, 95:5) ergab einen blassgelben amorphen Feststoff. Ausbeute: 3.88 g, 3.48 mmol (87%); $R_f = 0.45$ (DCM/MeOH, 95:5); Summenformel ($n = 22$): $\text{C}_{54}\text{H}_{110}\text{O}_{25}\text{S}_2$ (1223.56 $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$); HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 1245.6620$ (ber.: 1245.6675), $[\text{M}-\text{H}]^- = 1221.6920$ (ber.: 1221.6915);

^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3 , 25°C): $\delta[\text{ppm}] = 4.39$ (t, $J = 5.5$ Hz, 1H, $\text{CH}(\text{OEt})_2$), 3.44 (s, 66H, $(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n$), 3.35 (m, 2H, $(\text{MeCH}_2\text{O})_2\text{CH}$), 2.58 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H, CH_2SH), 2.52 (d, $J = 5.5$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}(\text{OEt})_2$), 2.37 (s, 1H, SH), 1.01 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H, CH_3);

^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3 , 25°C): $\delta[\text{ppm}] = 103.35$ ($\text{CH}(\text{OEt})_2$), 71.01 (CH_2), 70.68 (CH_2), 70.63 (CH_2), 70.35 (CH_2), 62.17 (CH_2), 35.62 (CH_2), 32.07 (CH_2SH), 15.36 (CH_3).

6.6.5 Herstellung der Aldehyd-funktionalisierten Mikrotiterplatten (143)**Aldehyd-Funktionalisierung der Mikrotiterplatten mit DTT**

Die Reaktionsfolge ist in Abbildung 4.13 A auf Seite 63 zu finden. Zu den Maleimid-funktionalisierten Mikrotiterplatten wurde eine 0.1 M Lösung von DTT im Additions-puffer (200 μl /Kavität) gegeben und 30 min geschüttelt. Nach 5-maligen Waschen mit Wasser wurde eine 0.1 M Lösung NaIO_4 -Lösung (0.1 M NaOAc , pH 5.5, 150 μl) den Kavitäten hinzugefügt und 1 Stunde geschüttelt. Es sollte darauf geachtet werden die Platten während der Oxidation vor Licht zu schützen. Nach dem 5-maligen Waschen wurden die Platten für Immobilisierungsversuche mit Peptidhydraziden verwendet.

Aldehyd-Funktionalisierung mit Mercapto-PEG-acetal-Linkers (**141**)

Eine 50 mM Lösung des Mercapto-PEG-acetal-Linkers (**141**) im Additionsbuffer 2 wurde auf schwarze Maleimid-funktionalisierte 96-Kavitäten Platten gegeben (100 µl pro Vertiefung). Nach 1 h Schütteln wurden die Vertiefungen dreimal mit Wasser gewaschen. Nicht umgesetzte Maleimid-Funktionalitäten wurden durch Zugabe von 100 mM *N*-Acetylcystein in Additionsbuffer 2 für 30 min blockiert. Danach wurde die Platte dreimal mit Wasser gewaschen. Um die Aldehydfunktion frei zugeben, wurde die Platte mit 2 M HCl/Aceton (2:1) für 1 h bei 50°C behandelt (200 µl pro Vertiefung). Anschließend wurde die Säure entfernt.

6.6.6 Hydrazid-Immobilisierung, Oberflächen-NCL und -Entschwefelung

Eventuell verbliebene Säure wurde weggespült (3x Waschen mit Wasser). Anschließend wurde eine 100 µM Lösung des zu immobilisierenden Peptidhydrazids (100 µl/Kavität) im Konjugationspuffer zu dem Aldehyd funktionalisierten Platten gegeben. Nach 2 h wurden die Vertiefungen (3x mit Wasser) gewaschen. Für die Oberflächen-Ligation wurden Peptidthioester in einer 100 µM Konzentration im Ligationspuffer 2 gelöst und geschüttelt um den MesNa-Thioester zu bilden. Nach 30 min wurde diese Lösung den Vertiefungen (100 µl/Vertiefung) zugesetzt. Die Mikrotiterplatte wurde 14 h - 20 h leicht geschüttelt. Danach wurden die Kavitäten gewaschen (3x Wasser, 3x Waschpuffer, 3x Wasser) und die Ausbeute mittels HRP-SA Assay bestimmt (Abschnitt 6.4.3, Seite 148). Anschließend wurde –falls nötig– Entschwefelungspuffer (100 µl/Kavität) auf die Platten gegeben. Die Mikrotiterplatte wurde fünf Stunden bei 50°C leicht geschüttelt. Nach dem Waschen (3x Wasser, 3x Waschpuffer, 3x Wasser) wurde erneut eine Ausbeutenbestimmung mittels HRP-SA-Test durchgeführt.

6.6.7 Synthese von 5/6-Carboxyfluorescein markierten Peptiden

Die Peptidsynthese wurde in einem 5- oder 10 µmol-Maßstab auf einem Rink-Amid-Harz durchgeführt. Die Kupplung von 5/6-Carboxyfluorescein (FAM) wurde unter Verwendung von 15 mg (40 µmol, 4 Äq.) durchgeführt FAM, 20.8 mg (40 µmol, 4 Äq.) PyBOP und 8.8 µl (80 µmol, 8 Äq.) NMM in 400 µl DMF für zweimal 2 h. Danach wurde das Peptidharz gewaschen (3× 1 ml 20% Piperidin in DMF, 5x DMF, 10× CH₂Cl₂). Das Peptid wurde durch Behandlung mit TFA/H₂O/TIS/EDT (94:2:2:2) vom polymeren Träger abgelöst.

FAM-BAIaBAIa-GTTNRGPPPLPPRA-NH₂ (155)

Das Peptid wurde im 5 µmol-Maßstab synthetisiert. Die Aufreinigung erfolgte mittels semipräparativer HPLC, Gradient: 03-30% B in 30 min. Ausbeute: Abs.₄₉₄ = 0.710 (20 ml, 2.15 µmol, 43%, ϵ_{494} = 66'000 l · mol⁻¹ · cm⁻¹). UPLC: t_R = 1.21 min (Gradient: 3-90% B in 4 min). Reinheit_{HPLC278nm} = 99%. ESI-MS: 1930.00 m/z (dekonv.), MALDI/TOF-MS: 1928.6 m/z ([M+H]⁺), (C₈₉H₁₂₄N₂₄O₂₅, berechnet: 1930.08 g · mol⁻¹).

FAM-BAIaBAIa-RPKRRAPPPVPPKP-NH₂ (156)

Das Peptid wurde im 10 µmol-Maßstab synthetisiert. Die Aufreinigung erfolgte mittels semipräparativer HPLC, Gradient: 03-30% B in 30 min. Ausbeute: Abs.₄₉₄ = 0.233 (1 ml (100-fache Verdünnung), 3.53 µmol, 35%, ϵ_{494} = 66'000 l · mol⁻¹ · cm⁻¹). UPLC: t_R = 1.24 min (Gradient: 3-60% B in 2 min). Reinheit_{HPLC278nm} = 98%. ESI-MS: 2124.32 m/z (dekonv.), MALDI/TOF-MS: 2124.8 m/z ([M+H]⁺), (C₁₀₁H₁₅₁N₂₉O₂₂, berechnet: 2123.46 g · mol⁻¹).

6.6.8 Oberflächen-Fluoreszenzsättigungsanalyse mit SH3-Domänen von Hefe

Zur Vorblockierung der Kavitäten sowie, um die SH3-Domänen zu falten, wurde jede Vertiefung mit 100 µl PBS-Puffer und 0.1 ma.% RBR versetzt. Die Titerplatte wurde 1 h geschüttelt. Der Nullwert der Fluoreszenz in diesem Platten wurde bestimmt. Anschließend wurde das FAM-markierte Peptid in Konzentrationen von 0.02 µM, 0.05 µM, 0.1 µM und 0.2 µM im Puffer (0.1 ma.% RBR in PBS) zu je vier Vertiefungen hinzugefügt. Nach 30 min Inkubation mit den FAM-Peptiden, wurde der Puffer aus den Vertiefungen durch Schleudern der Platte entfernt. Danach wurden die Wells 3× mit PBS-Puffer gewaschen (100 µl pro Vertiefung). Zum Waschen wurde die Titerplatte mit einer Frequenz von 600 rpm über 5-10 sec geschüttelt. Schließlich wurden 100 µl PBS in jede Vertiefung gegeben, und die Fluoreszenz wurde mit einem Plattenlesegerät gemessen (1s Zeitählung pro Vertiefung, 485 nm Anregungswellenlänge mit normaler Öffnung 4 mm, 535 nm Emissionswellenlängenfilter mit kleinen Öffnung 4 mm). Danach wurden die Vertiefungen mit neuen Konzentrationen 0.39 µM, 0.78 µM, 1.56 µM bzw. 3.13 µM desselben FAM-Peptids (0.1 ma.% RBR in PBS) versetzt. Nach 30 min Inkubation, Waschen und Fluoreszenzmessungen wurde das Verfahren mit Konzentrationen von 6.25 µM, 12.5 µM, 25 µM oder 50 µM des FAM markierten Peptids wiederholt. Die Messungen wurden in vierfacher Ausfertigung durchgeführt. Das Waschen mit Millipore-HQ-Wasser löste gebundene und ungebundene Liganden (unspezifische Bindung) von der Platte ab. Fluoreszenzmessung nach mehrmaligem Waschen mit Wasser zeigt

kein gebundenes Peptid mehr in den Platten. Die erneute Bestimmung der Stoffmenge von oberflächengebundenen SH3-Domänen mittels HRP-SA-Assay (Abschnitt 6.4.3, Seite 148) bestätigte allerdings, dass die Domänen sich noch auf der Oberfläche befanden. Die Platte konnte somit für andere Bindungstest mit anderen Liganden verwendet werden. Für die Messung des 3PB1 (**203**) und des ID-Peptids (**206**) wurden die Konzentration in jedem Titrationsschritt verdoppelt.

Die Daten wurden unter Verwendung von Prism 5.03 für Windows (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) analysiert. Die Messungen von vier Vertiefungen mit identischen Konzentrationen von FAM-Peptid repräsentieren einen Datenpunkt. Die vier Werte jeder Vertiefung wurden verwendet um Mittelwerte und Standardabweichung (SD) von diesem Datenpunkt zu berechnen (SD wurde für Fehlerbalken verwendet). Die vier letzten Datenpunkte wurden verwendet, um den linearen Anteil unspezifischer Adsorption an der Platte zu subtrahieren. Die Steigung dieser vier Datenpunkte wurde mittels linearer Regression bestimmt und 70% der Steigung von allen Werten abgezogen. Der Prozentsatz von 70% wurde als der beste ermittelt, um Literaturbekannte oder über andere Methoden ermittelte K_D -Werte zu reproduzieren (Fluoreszenzpolarisation, Tryptophan Fluoreszenz). Dieses Verfahren war notwendig, da manche Messungen einen hohen Anteil an unspezifischer Bindung des FAM-Peptids vermuten ließen. Die unspezifische Adsorption würde bei Proteinen mit niedriger Affinität verhältnismäßig hohe Mengen gebundener Liganden vortäuschen. Die berechneten K_D -Werte wären zu klein, womit die Affinität überschätzt wird. Bei vielen Messungen hatte die Substitution keinen Einfluss auf das Ergebnis. Zwei Beispiele für eine Regression mit und ohne Berücksichtigung von nicht-spezifische Adsorption sind unten gezeigt. Bei geringer unspezifischer Adsorption des Peptids und hoher Affinität zu der SH3-Domäne war der erhaltene K_D -Wert vor und nach der Hintergrundkorrektur identisch (Abbildung 6.5 links). Bei Peptiden die eine hohe Tendenz zur Adsorption an der Platte sowie eine geringe Affinität zur Domäne hatten war das Vorgehen notwendig (Abbildung 6.5 rechts).

Beispiel für die Hintergrundkorrektur bei der Oberflächen-Fluoreszenzsättigungs-Analyse

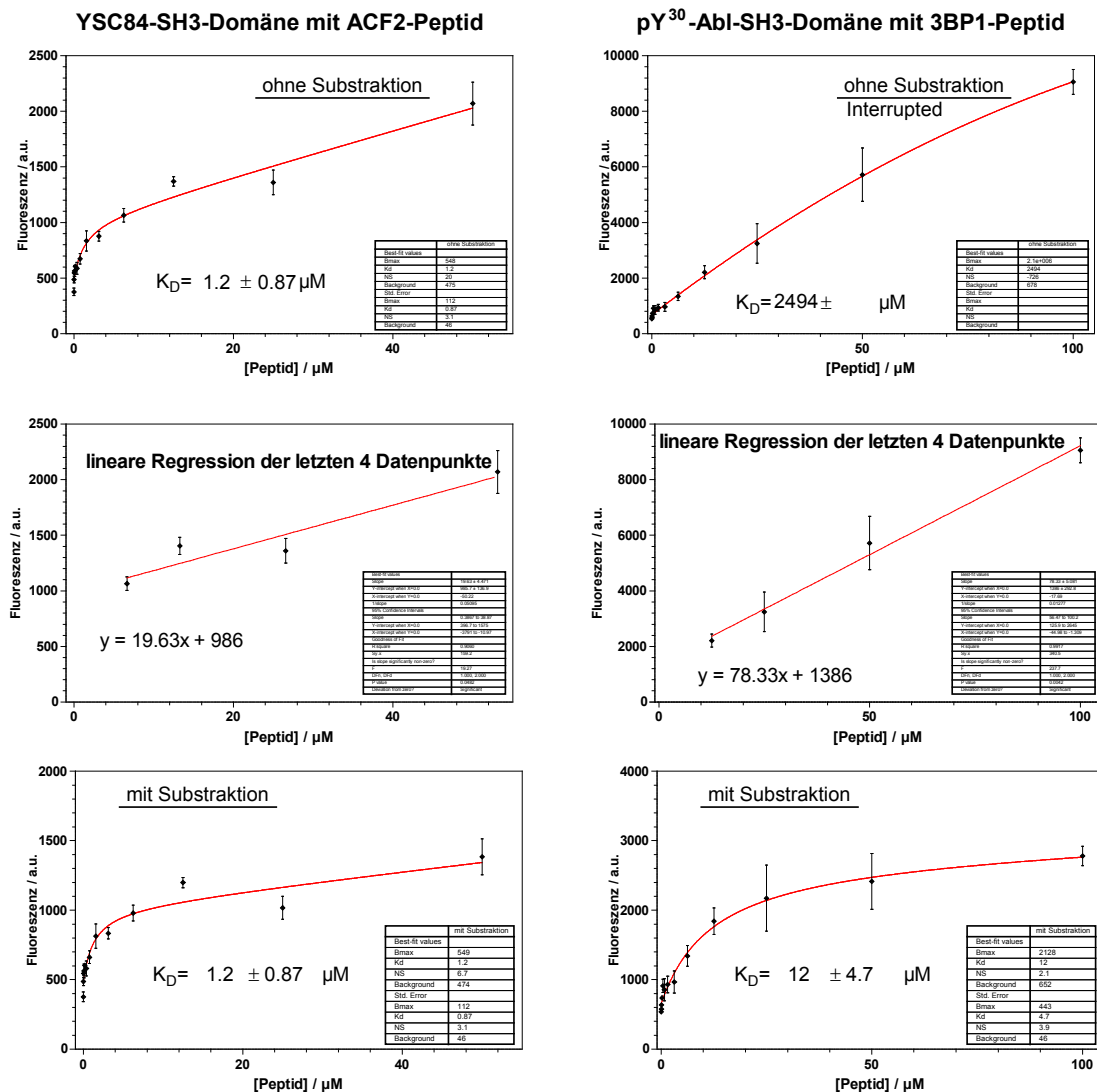
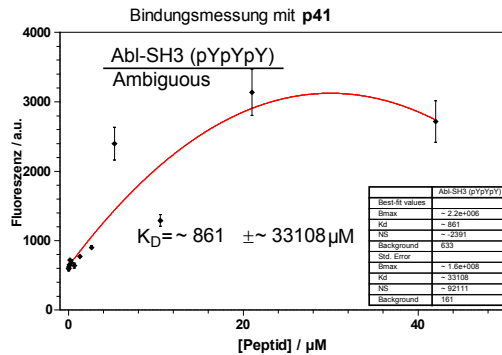
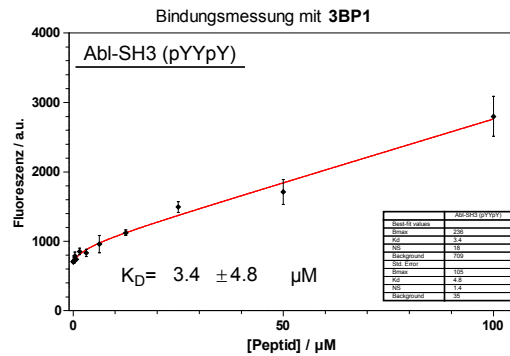
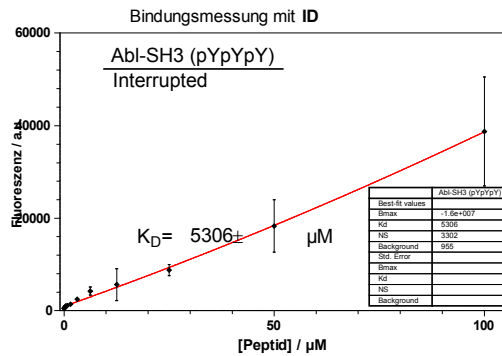
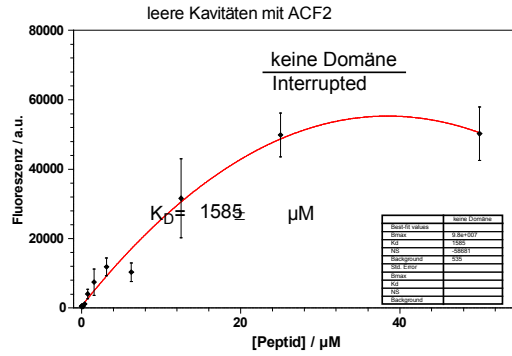
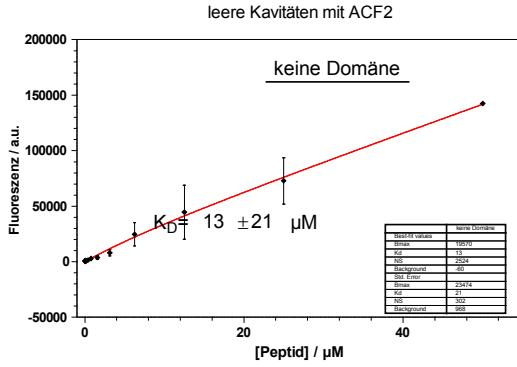


Abbildung 6.5 Beispiele für die Durchführung einer Hintergrundkorrektur der bei der Oberflächen-Fluoreszenzsättigungsanalyse erhaltenen Daten. Links ist die Korrektur für eine Affinitätsmessung gezeigt, bei der die Hintergrundkorrektur keine Änderung der berechneten Affinität ergab. Rechts ist eine Analyse dargestellt, bei der ohne Hintergrundkorrektur keine Affinität berechnet werden.

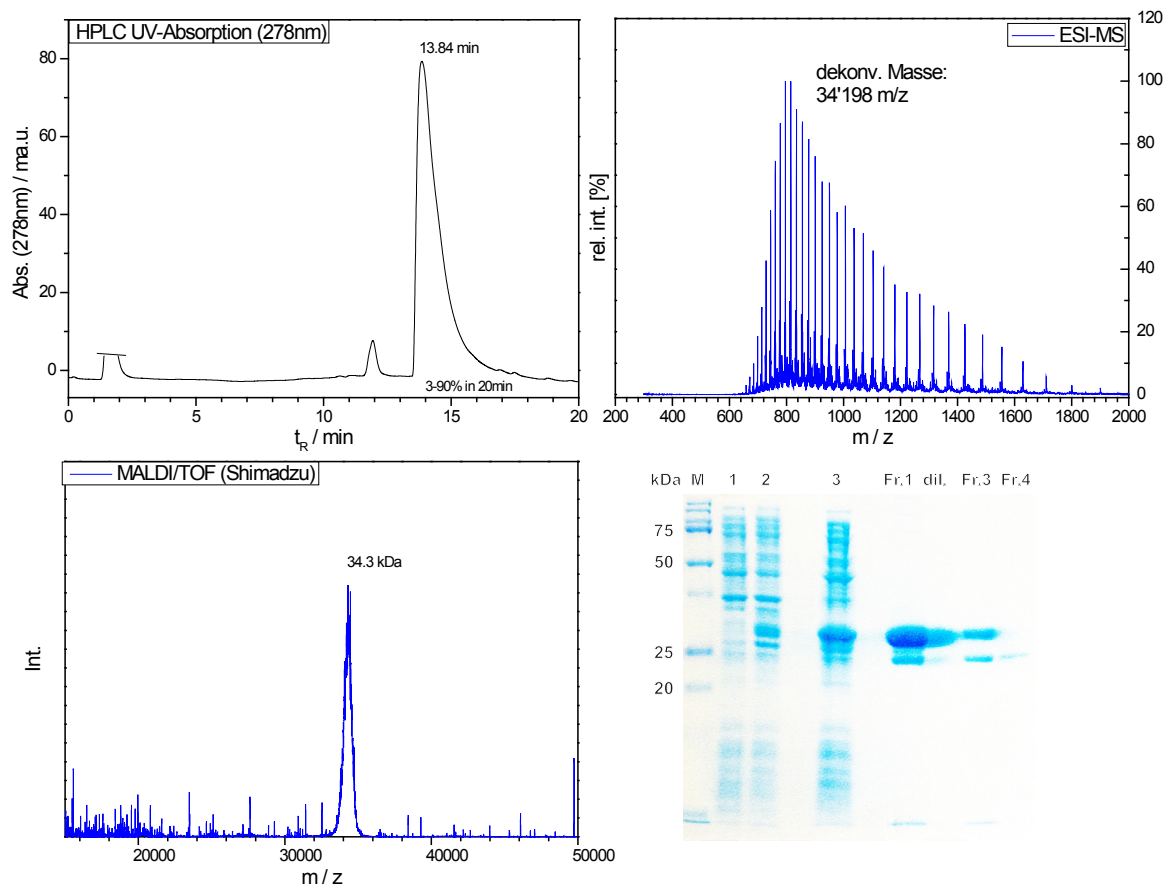
In jeden Fall wurde der lineare Anteil, der durch Regression der letzten vier Datenpunkte ermittelt wurde, von den erhalten Messpunkten subtrahiert und danach wurden mit diesen Hintergrund-korrigierten Datenpunkten die hyperbole Regressionen nach Gl. 2 (Seite 68) mit GraphPad Prism durchgeführt. Alle ermittelten Datenpunkte mit zugehörigen Bindungsisothermen sind im Anhang zu finden.



Die Software zeigte „*interrupted*“ oder „*ambiguous*“, wenn die Regression mit den eingegebenen Datenpunkten nicht erfolgreich oder unklar war. In einigen Fällen glückte die Regression, dennoch waren die Fehler der K_D -Werte größer als die K_D -Werte. Die Bindungsanalysen bei denen diese drei Arten von Regressionsergebnissen auftraten wurden als „keine Affinität bestimmbar“ (kAb) klassifiziert. Zum Vergleich der Messungen und Regressionen von leeren Kavitäten und Platten mit Domänen die nach der oben genannten Definition keine bestimmbaren Affinitäten zu den getesteten Bindern hatten, sind unten gezeigt.

Expression und Reinigung des YSC84 SH3-GST-Fusionsproteins

Die Expression des GST-SH3-Domäne (YSC84) Fusionsproteins wurde von *Cesareni et al.* beschrieben.^[275] Ein geeigneter Expressionsvektor pGEX-2TK wurde von Prof. *Gianni Cesareni* (Institut für Biologie, Universität Rom Tor Vergata, Rom, Italien) gestiftet, in DH5 α -Zellen amplifiziert und für die Transformation von BL21(D3)-*Escherichia coli*-Zellen verwendet. Das überexprimierte GST-Fusionsprotein wurde durch Glutathion-Sepharose-Affinitätschromatographie über eine 5 ml GST-Trap-MHP-Säule von *General Electric* mittels FPLC gereinigt. Die Reinheit sowie eine Massenzuordnung wurde durch SDS-PAGE, MALDI-MS-Analyse und HPLC-MS (siehe unten) bestimmt. Die gereinigte Proteinlösung wurde in dem Puffer aliquotiert und bei -25°C aufbewahrt. Die Proteinkonzentration wurde über die Absorption bei 278 nm ($\epsilon_{278} = 56'000 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) bestimmt.



Charakterisierung der rekombinanten YSC84 SH3-Domäne mit GST fusioniert. Oben links: HPLC-Spur von FPLC-Fraktion 1. Oben rechts: ESI-MS-Spektren von Peak bei 13.84 min in der HPLC. Unten links: MALDI-TOF-Spektren von FPLC-Fraktion 1. Unten rechts: SDS-PAGE (5% Stacking und 10% Laufgel, Färbung: Coomassie), M: Marker, 1: nicht induzierten Zellen, 2: induzierten Zellen, 3: Gesamt Zelllysat vor der Reinigung, Fr.: Fraktion von FPLC Reinigung, dil. = verdünnte Fr.1

Synthese der A21C-Mutante der YSC84-SH3-Domäne (93) durch NCL in Lösung

Der Peptidthioester **54** (400 nmol) und das Cysteinylopeptid **71** (440 nmol) wurden bei 1.0 mM Konzentration im Puffer (0,1 M NaH₂PO₄, 6 M GdmCl, 50 mM NaAsc, 20 mM TCEP, 1 vol.% PhSH, pH 7.5) gelöst. Das Reaktionsgemisch wurde 3 Tage geschüttelt. HPLC-Reinigung ergab 36% des gewünschten Produkts. Ausbeute: Abs.₂₇₈ = 0.223 (1 ml, 145 nmol, 36%, $\epsilon_{278} = 15'400 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). UPLC: $t_R = 1.39 \text{ min}$ (Gradient: 3-90% B in 4 min). Reinheit_{UPLC278nm} = 98%. ESI-MS: 7740.74 m/z (dekonv.), MALDI/ TOF-MS: 7763.0 m/z ([M+H]⁺) (C₃₄₆H₅₂₀N₁₀₂O₉₈S₂, berechnet: 7740.58 g · mol⁻¹).

6.6.9 Fluoreszenzpolarisations-Bindungsassay

Der Fluoreszenzpolarisations-Bindungsassay wurde unter Verwendung von schwarzen 96-Well-Platten mit flachem Boden (*PerkinElmer*) und des Victor X3-Plattenlesegeräts durchgeführt. In jede Kavität wurden 5 nM FAM-markiertes Peptid im FP-Puffer (0,1 M Na₂HPO₄, 100 µg/ml Rinder γ -Globulin, 0.02 ma.% Natriumazid, pH 7.4, 125 µl/Kavität) gegeben. Anschließend wurden die rekombinanten GST-markierten oder die synthetischen SH3-Domänen ebenfalls im FP-Puffer zu den FAM-Peptid in die Kavitäten gegeben (Endkonzentration 0-100 µM). Die Titerplatte wurde 3 Stunden geschüttelt, auch um die Faltung der Domänen zu fördern. Danach wurden die Polarisationswerte in Millipolarisationseinheiten (mP) bestimmt (Anregungswellenlänge 485 nm, Filter mit normaler Polarisator Öffnung (4 mm), Emissionswellenlängenfilter 535 nm mit normaler Öffnung (4 mm), 1 s Messzeit pro Vertiefung). Die gewonnenen Daten wurde unter Verwendung von GraphPad Prism 5.03 für Windows ausgewertet. Die Werte wurden durch nichtlinearen Regression an Gl. 2 angenähert und somit die K_D-Werte bestimmt. Alle ermittelten Daten sind im Anhang zu finden.

6.7 Experimentelle Vorschriften zu Unterkapitel 4.4

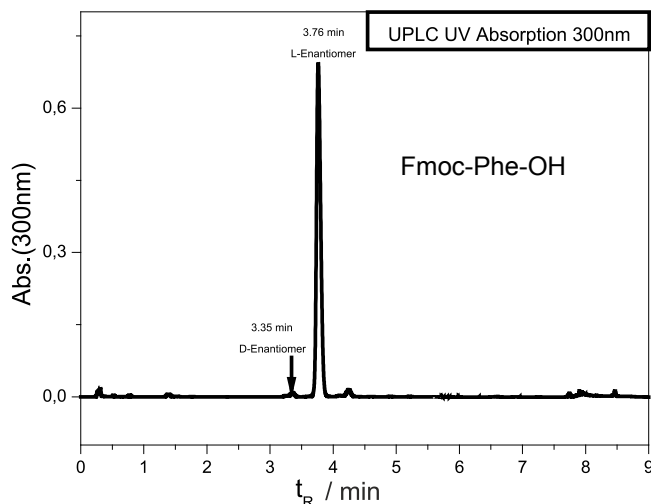
Die in diesem Kapitel beschriebenen Arbeiten wurden zusammen mit *Olaf Fuchs* im Rahmen seiner Bachelorarbeit mit dem Titel: „*Optimierung der selbstreinigenden Synthese von α -Peptidthioestern, zur Generierung Phosphotyrosin-haltiger SH3-Domänen.*“ durchgeführt.

6.7.1 Optimierung der Erstbeladung von Sulfonamid-PEG-Harzen

Die Optimierungsversuche wurden mit einem Rinkamid-ChemMatrix-Harz durchgeführt. Das Harz wurde nach dem Protokoll (Abschnitt 6.3.1, Seite 143) in einem

50 μmol -Ansatz mit Glu und Tyr beladen. Entsprechend dem Protokoll für die Harzsynthese der selbstreinigenden Peptidthioestersynthese (Abschnitt 6.4.1, Seite 144), wurde das Harz mit 3-Carboxypropansulfonamid beladen (200 μmol , 4 Äq.) wobei das *N*-Sulfonamid-Dipeptid beladene Harz **173** erhalten wurde.

Optimierungsversuche zur Erstbeladung auf das Sulfonamid-Harz **173**: Es wurden je ca. 2 μmol Aliquote des Harzes **173** für die Optimierungsversuche verwendet. Die entsprechende Menge an getrocknetem Harz wurde in einem Spritzenreaktor vorgelegt und 15 Minuten in Chloroform gequollen. Nach dem Abfiltrieren des Überstandes wurden die Kupplungskonditionen zur Beladung von Fmoc-Phe-OH verwendet die in Tabelle 4.3 und Tabelle 4.5 auf Seite 76, 77 aufgeführt sind. Die Ausbeuten wurden mittels Absorption der Fmoc-Abspaltungslösung, wie in Abschnitt 6.1 auf Seite 139 beschrieben, bestimmt. Anschließend wurde Glu gekuppelt, um eine Trennung der Diastereomere wahrscheinlicher zu machen. Fmoc wurde nicht abgespalten. Dann wurde das *N*-Fmoc-Peptid vom polymeren Träger gelöst. Die Epimerisierungswerte wurden mittels UPLC-MS bestimmt. Es wurde davon ausgegangen, dass es sich bei dem intensivsten Signal also bei dem Hauptprodukt um das (L)Phe-Diastereomer **174** handelt. Ein zweites weniger intensives Signal mit dem gleichen Massenspektrum wurde als -(D)Phe-Diastereomer **174'** angenommen. Die beiden Signale waren Basislinien-getrennt (siehe unten). Zur Quantifizierung wurden das Integral des EIC-Peaks bei der Retentionszeit des (D) und des (L)-Diastereomers verwendet.



Optimierte Erstbeladungsbedingung: Die Reaktionsbedingung welche die höchste Ausbeute und die niedrigste Epimerisierung zeigten sind im Folgenden beschrieben (bezogen auf 2 μmol Sulfonamid-Harz **173**).

Erst wurde das Harz 15 min in CHCl_3 in einem Spritzenreaktor gequollen. Anschließend wurden 4.2 mg PyBOP (8 μmol , 4 Äq.) in 10 μl CHCl_3 (1.2 M) sowie 4 Äq. der Fmoc-geschützten Aminosäure in 110 μl CHCl_3 /DIEA (7:3) gelöst. Die Lösungen und der Spritzenreaktor wurden mindestens 10 Minuten auf -25°C gekühlt. Anschließend wurden möglichst schnell beide Lösungen vermischt und auf das Harz gegeben. Der Spritzenreaktor wurde zwei Stunden wieder in eine -25°C -Umgebung (Tiefkühler) gebracht und alle 15 Minuten kurz geschüttelt. Diese Prozedur wurde einmal wiederholt. Das Harz wurde fünfmal mit DMF gewaschen und 5 min nach Standardprotokoll blockiert.

Ausbeuten und Epimerisierungswerte bei optimaler Kupplung aller proteinogenen Aminosäuren: Die Kupplung auf das Sulfonamid-Harz **173** erfolgte wie oben bei „Optimierte Erstbeladungsbedingung“ beschrieben mit allen 20 proteinogenen Aminosäuren (auch erneut mit Fmoc-Phe-OH). Die Fmoc-Ausbeuten wurden ebenfalls wie oben beschrieben bestimmt (Tabelle 4.5, Seite 78). Zusätzlich wurden die Ausbeuten aus den erhaltenen UPLC-Messungen überprüft, indem die Nebenprodukte mittels EIC gesucht und quantifiziert wurden. Im Vergleich mit dem Hauptprodukt entsprachen die EIC-Ausbeuten den Fmoc-Ausbeuten. Die Epimerisierungswerte wurden ebenfalls wie oben für Phe beschrieben ermittelt. Bei den Experimenten die mit Werten von $<0.1\%$ angegeben sind, wurde ein Massensignal der entsprechenden Diastereomerenmasse bei einer anderen Retentionszeit als dem Hauptpeak gefunden. Das EIC-Signal war allerdings zu gering für eine Integration. Die Chromatogramme sind im Anhang im Unterkapitel 10.1 ab Seite 218 zu finden.

6.7.2 Optimierte selbstreinigende Peptidthioestersynthese auf PEG-AM-Harz

Die Thioester wurden nach dem Protokoll für die selbstreinigende Thioester Synthese im Abschnitt 6.4.1 (Seite 144) synthetisiert und gereinigt. Durch die Verwendung des PEG-AM-Harzes ergaben sich allerdings Abweichungen vom Protokoll, die hier im Folgenden aufgeführt sind: Der Bromphenolblau-Test kann bei der Synthese des 4-Sulfamylbutyryl-(PhiPr)glutamyl-Glycin-Polyethylenglycol-Harzes **47** nicht angewendet werden, da Bromphenolblau unspezifisch gebunden im Harz verbleibt. Darüber wird von dem Polyethylenglycol-Harz im Vergleich zum Polystyrol-Harz mehr Wasser gebunden. Vor Reaktionsschritten, bei denen Wasser stören könnte, muss das Harz daher intensiv getrocknet werden. Diese Schritte sind: die Kupplung des Zyklisierungslinkers **48**, die Mmt- und PhPr-Abspaltung und die Aktivierung des Sulfonamids. Für die intensive Trocknung wird das Harz gewaschen (5x DMF, 5x trockenes THF, 5x

trockenes DCM) und anschließend am Feinvakuum ($P < 0.1$ mbar) für mindestens 30 min getrocknet, so dass das Harz keine gelartige Struktur mehr hat.

Verbesserte selbstreinigende Synthese der Abl- und Arg-Peptidthioester

Die Abl- und Arg-Peptidthioester wurden nach dem optimierten Protokoll für die selbstreinigende Peptidthioestersynthese (6.7.2) hergestellt. Die erste und letzte Aminosäure wurde manuell gekuppelt. Ebenso wurde das Pseudoprolin-Dipeptid Fmoc-Leu-Ser(Ψ (Me,Me)Pro)-OH manuell an der LS-Position eingebaut. Die restlichen Aminosäuren wurden automatisiert gekuppelt (Abschnitt 6.3.2, Seite 144). Die Peptide wurden ohne zusätzliche Aufreinigung nach der TFA-Abspaltung vom polymeren Träger verwendet.

K^(Bt)NLFVALYDFVASGDNTLSITKGEKLRVLGYNHNGEW-SBzl (177)

Das Peptid wurde im 10 μ mol-Maßstab synthetisiert. Ausbeute: Abs.₂₇₈ = 0.200 (2 ml, 0.48 μ mol, 5%, ϵ_{278} = 8'400 l · mol⁻¹ · cm⁻¹). UPLC: t_R = 1.35 min (Gradient: 10-90% B in 4 min). Reinheit_{UPLC278nm} = 92%. ESI-MS: 4502.67 m/z (dekonv.), MALDI/TOF-MS: 4503.2 m/z ([M+H]⁺) (C₂₀₇H₃₁₀N₅₇O₅₇S₂, berechnet: 4503.12 g · mol⁻¹).

H-K^(Bt)NLFVALpYDFVASGDNTLSITKGEKLRVLGYNHNGEW-SBzl (178)

Das Peptid wurde im 10 μ mol-Maßstab synthetisiert. Ausbeute: Abs.₂₇₈ = 0.163 (3 ml, 0.65 μ mol, 7%, ϵ_{278} = 7'560 l · mol⁻¹ · cm⁻¹). UPLC: t_R = 2.88 min (Gradient: 3-90% B in 4 min). Reinheit_{UPLC278nm} = 80%. ESI-MS: 4583.8 m/z (dekonv.), MALDI/TOF-MS: 4582.4 m/z ([M+H]⁺) (C₂₀₇H₃₁₁N₅₂O₆₀S₂P, berechnet: 4583.10 g · mol⁻¹).

H-K^(Bt)NLFVALYDFVASGDNTLSITKGEKLRVLGpYNHNGEW-SBzl (179)

Das Peptid wurde im 10 μ mol-Maßstab synthetisiert. Ausbeute: Abs.₂₇₈ = 0.235 (3 ml, 0.62 μ mol, 6%, ϵ_{278} = 7'560 l · mol⁻¹ · cm⁻¹). UPLC: t_R = 3.03 min (Gradient: 3-90% B in 4 min). Reinheit_{UPLC278nm} = 91%. ESI-MS: 4582.84 m/z (dekonv.), MALDI/TOF-MS: 4583.7 m/z ([M+H]⁺) (C₂₀₇H₃₁₁N₅₂O₆₀S₂P, berechnet: 4583.10 g · mol⁻¹).

H-K^(Bt)NLFVALpYDFVASGDNTLSITKGEKLRVLGpYNHNGEW-SBzl (180)

Das Peptid wurde im 10 μ mol-Maßstab synthetisiert. Ausbeute: Abs.₂₇₈ = 0.133 (3 ml, 0.48 μ mol, 5%, ϵ_{278} = 6'920 l · mol⁻¹ · cm⁻¹). UPLC: t_R = 1.35 min (Gradient: 10-90% B in 4 min). Reinheit_{UPLC278nm} = 90%. ESI-MS: 4662.55 m/z (dekonv.), MALDI/TOF-MS: 4664.0 m/z ([M+H]⁺) (C₂₀₇H₃₁₂N₅₂O₆₃S₂P₂, berechnet: 4663.08 g · mol⁻¹).

K^(Bt)NLFVALYDFVASGDNTLSITKGEKLR-SBzl (193)

Das Peptid wurde im 10 μmol -Maßstab synthetisiert. Ausbeute: $\text{Abs}_{.278} = 0.273$ (1 ml, 1.95 μmol , 20%, $\epsilon_{278} = 1'400 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). UPLC: $t_R = 2.81 \text{ min}$ (Gradient: 3-90% B in 4 min). Reinheit $_{\text{UPLC}278\text{nm}} = 98\%$. ESI-MS: 3333.27 m/z (dekonv.), MALDI/TOF-MS: 3332.6 m/z ($[\text{M}+\text{H}]^+$) ($\text{C}_{153}\text{H}_{239}\text{N}_{37}\text{O}_{42}\text{S}_2$, berechnet: 3332.89 $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$).

K^(Bt)NLFVALpYDFVASGDNTLSITKGEKLR-SBzl (194)

Das Peptid wurde im 10 μmol -Maßstab synthetisiert. Ausbeute: $\text{Abs}_{.278} = 0.250$ (1 ml, 3.78 μmol , 38%, $\epsilon_{278} = 1'400 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). UPLC: $t_R = 2.81 \text{ min}$ (Gradient: 3-90% B in 4 min). Reinheit $_{\text{UPLC}278\text{nm}} = 94\%$. ESI-MS: 3412.60 m/z (dekonv.), MALDI/TOF-MS: 3414.0 m/z ($[\text{M}+\text{H}]^+$) ($\text{C}_{153}\text{H}_{240}\text{N}_{37}\text{O}_{45}\text{S}_2\text{P}$, berechnet: 3412.87 $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$).

6.8 Experimentelle Vorschriften zu Unterkapitel 4.5

Die benötigten Peptidhydrazide wurden nach der Methode aus Abschnitt 6.6.1 (Seite 157) hergestellt. Da sowohl die Abl- als auch Arg-Peptidhydrazide ein C-terminales Asparagin in der Sequenz aufwiesen, wurden alle Peptide mit einem C-terminalen β -Alanin-Rest synthetisiert. Die Peptide wurden ohne Aufreinigung verwendet. Die FAM-markierten Peptidbinder wurden nach dem Protokoll aus Abschnitt 6.6.7 (Seite 163) hergestellt. Die Oberflächen-Synthese der Domänen wurde nach der Methode durchgeführt, die in Abschnitt 6.6.6 (Seite 163) beschrieben ist. Die K_D -Wertbestimmung erfolgte durch Oberflächen-Fluoreszenzsättigungsanalyse (Abschnitt 6.6.8, Seite 164).

H-CEAQTKNGQGWPVSNIYITPVNBAla-N₂H₃ (175)

Das Peptid wurde im 11.5 μmol -Maßstab basierend auf der ersten Aminosäure synthetisiert. Ausbeute: $\text{Abs}_{.278} = 0.678$ (7 ml, 7.72 μmol , 67%, $\epsilon_{278} = 7'000 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). HPLC: $t_R = 10.2 \text{ min}$ (Gradient: 3-90% B in 20 min). Reinheit $_{\text{UPLC}278\text{nm}} = 95\%$. ESI-MS: 2391.37 m/z (dekonv.), MALDI/TOF-MS: 2392.1 m/z ($[\text{M}+\text{H}]^+$) ($\text{C}_{103}\text{H}_{159}\text{N}_{31}\text{O}_{33}\text{S}$, berechnet: 2391.62 $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$).

H-CEAQTKNGQGWPVSNpYITPVNBAla-N₂H₃ (176)

Das Peptid wurde im 10 μmol -Maßstab synthetisiert. Ausbeute: $\text{Abs}_{.278} = 0.536$ (3 ml, 4.35 μmol , 44%, $\epsilon_{278} = 6'150 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). UPLC: $t_R = 1.64 \text{ min}$ (Gradient: 3-90% B in 4 min). Reinheit $_{\text{UPLC}278\text{nm}} = 46\%$. ESI-MS: 2471.60 m/z (dekonv.), MALDI/TOF-MS: 2472.7 m/z ($[\text{M}+\text{H}]^+$) ($\text{C}_{103}\text{H}_{159}\text{N}_{31}\text{O}_{33}\text{S}$, berechnet: 2471.60 $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$).

H-Pen-LGYNQNGEWSEVRSKNGQGWPVSNYITPVNβAla-N₂H₃ (189)

Das Peptid wurde im 5 μmol-Maßstab synthetisiert. Ausbeute: Abs.₂₇₈ = 0.454 (3 ml, 1.03 μmol, 20%, ε₂₇₈ = 14'000 l · mol⁻¹ · cm⁻¹). HPLC: t_R = 10.6 min (Gradient: 3-90% B in 20 min). Reinheit_{UPLC278nm} = 46%. ESI-MS: 3610.78 m/z (dekonv.), MALDI/TOF-MS: 3611.3 m/z ([M+H]⁺) (C₁₅₈H₂₃₇N₄₇O₄₉S, berechnet: 3610.92 g · mol⁻¹).

H-Pen-LGpY₁NQNGEWSEVRSKNGQGWPVSNYITPVNβAla-N₂H₃ (190)

Das Peptid wurde im 10 μmol-Maßstab synthetisiert. Ausbeute: Abs.₂₇₈ = 0.664 (2 ml, 5.72 μmol, 57%, ε₂₇₈ = 13'160 l · mol⁻¹ · cm⁻¹). HPLC: t_R = 10.3 min (Gradient: 3-90% B in 20 min). Reinheit_{UPLC278nm} = 77%. ESI-MS: 3690.72 m/z (dekonv.), MALDI/TOF-MS: 3692.0 m/z ([M+H]⁺) (C₁₅₈H₂₃₈N₄₇O₅₂PS, berechnet: 3690.90 g · mol⁻¹).

H-Pen-LGYNQNGEWSEVRSKNGQGWPVSNpYITPVNβAla-N₂H₃ (191)

Das Peptid wurde im 10 μmol-Maßstab synthetisiert. Ausbeute: Abs.₂₇₈ = 0.530 (9 ml, 6.5 μmol, 57%, ε₂₇₈ = 13'160 l · mol⁻¹ · cm⁻¹). UPLC: t_R = 1.96 min (Gradient: 3-90% B in 4 min). Reinheit_{UPLC278nm} = 25%. ESI-MS: 3690.99 m/z (dekonv.), MALDI/TOF-MS: 3693.2 m/z ([M+H]⁺) (C₁₅₈H₂₃₈N₄₇O₅₂PS, berechnet: 3690.90 g · mol⁻¹).

H-Pen-LGpY₁NQNGEWSEVRSKNGQGWPVSNpYITPVNβAla-N₂H₃ (192)

Das Peptid wurde im 10 μmol-Maßstab synthetisiert. Ausbeute: Abs.₂₇₈ = 0.532 (9 ml, 3.62 μmol, 36%, ε₂₇₈ = 12'320 l · mol⁻¹ · cm⁻¹). UPLC: t_R = 1.86 min (Gradient: 3-90% B in 4 min). Reinheit_{UPLC278nm} = 15%. ESI-MS: 3770.91 m/z (dekonv.), MALDI/TOF-MS: 3775.0 m/z ([M+H]⁺) (C₁₅₈H₂₃₉N₄₇O₅₅P₂S, berechnet: 3770.88 g · mol⁻¹).

FAM-βAlaβAla-APTMPPLPP-NH₂ (203)

Das Peptid wurde im 10 μmol-Maßstab synthetisiert. Ausbeute: Abs.₂₇₈ = 0.232 (50-fache Verdünnung 1 ml 1.76 μmol, 18%, ε₄₉₄ = 66'000 l · mol⁻¹ · cm⁻¹). UPLC: t_R = 2.25 min (Gradient: 3-90% B in 4 min). Reinheit_{UPLC278nm} = 95%. ESI-MS: 1516.40 m/z (dekonv.), MALDI/TOF-MS: 1516.0 m/z ([M+H]⁺) (C₇₅H₉₇N₁₃O₁₉S, berechnet: 1516.71 g · mol⁻¹).

FAM-βAlaβAla-PPAYPPPPVP-NH₂ (204)

Das Peptid wurde im 10 μmol-Maßstab synthetisiert. Ausbeute: Abs.₂₇₈ = 0.827 (10-fache Verdünnung 1 ml, 1.25 μmol, 13%, ε₄₉₄ = 66'000 l · mol⁻¹ · cm⁻¹). UPLC: t_R = 1.40

min (Gradient: 3-90% B in 4 min). Reinheit_{UPLC278nm} = 99%. ESI-MS: 1530.45 m/z (dekonv.), MALDI/ TOF-MS: 1531.0 m/z ([M+H]⁺) (C₇₉H₉₅N₁₃O₁₉, berechnet: 1530.68 g · mol⁻¹).

FAM-BAIaBAIa-APSYSPPPP-NH₂ (205)

Das Peptid wurde im 10 µmol-Maßstab synthetisiert. Ausbeute: Abs.₂₇₈ = 0.465 (50-fache Verdünnung 1 ml, 4.42 µmol, 44%, ε₄₉₄ = 66'000 l · mol⁻¹ · cm⁻¹). UPLC: t_R = 1.86 min (Gradient: 3-90% B in 4 min). Reinheit_{UPLC278nm} = 96%. ESI-MS: 1508.64 m/z (dekonv.), MALDI/ TOF-MS: 1508.8 m/z ([M+H]⁺) (C₇₅H₈₉N₁₃O₂₁, berechnet: 1508.58 g · mol⁻¹).

FAM-BAIaBAIa-PAPKRNKPTVYGVSPNY-NH₂ (206)

Das Peptid wurde im 10 µmol-Maßstab synthetisiert. Ausbeute: Abs.₂₇₈ = 0.701 (30-fache Verdünnung 1 ml, 3.83 µmol, 38%, ε₄₉₄ = 66'000 l · mol⁻¹ · cm⁻¹). UPLC: t_R = 1.95 min (Gradient: 3-90% B in 4 min). Reinheit_{UPLC278nm} = 91%. ESI-MS: 2387.28 m/z (dekonv.), MALDI/ TOF-MS: 2388.6 m/z ([M+H]⁺) (C₁₁₃H₁₅₅N₂₇O₃₁, berechnet: 2387.60 g · mol⁻¹).

6.9 Experimentelle Vorschriften zu Unterkapitel 4.6

Fragmentsynthese für die vergleichende Synthese der Abl-(Phospho)SH3-Domänen in Lösung

Die *N*-terminalen und *C*-terminalen Fragmente für die vergleichende Synthese der Abl-(Phospho)SH3-Domänen durch NCL in Lösung wurden als Peptidhydrazide entsprechend Abschnitt 6.6.1 (Seite 157) hergestellt. Sie wurden automatisiert synthetisiert und nach der Synthese mit der präparativen HPLC gereinigt.

H-CEAQTKNGQGWPVSNYITPVNBAla-N₂H₃ (175) –gereinigt

Das Peptid wurde im 20 µmol-Maßstab synthetisiert. Ausbeute: Abs.₂₇₈ = 0.250 (20-fache Verdünnung 1 ml, 7.18 µmol, 36%, ε₂₇₈ = 7'000 l · mol⁻¹ · cm⁻¹). UPLC: t_R = 2.3 min (Gradient: 3-90% B in 4 min). Reinheit_{UPLC278nm} = 98%. ESI-MS: 2390.48 m/z (dekonv.), MALDI/ TOF-MS: 2391.5 m/z ([M+H]⁺) (C₁₀₃H₁₅₉N₃₁O₃₃S, berechnet: 2391.62 g · mol⁻¹).

H-CEAQTKNQGQWVPSNpYITPVNBAla-N₂H₃ (176)–gereinigt

Das Peptid wurde im 10 µmol-Maßstab synthetisiert. Ausbeute: Abs.₂₇₈ = 0.617 (3 ml, 2.96 µmol, 30%, ϵ_{278} = 6'150 l · mol⁻¹ · cm⁻¹). UPLC: t_R = 1.79 min (Gradient: 3-90% B in 4 min). Reinheit_{UPLC278nm} = 98%. ESI-MS: 2471.61 m/z (dekonv.), MALDI/TOF-MS: 2472.7 m/z ([M+H]⁺) (C₁₀₃H₁₅₉N₃₁O₃₃S, berechnet: 2471.60 g · mol⁻¹).

H-KNLFVALYDFVASGDNTLSITKGEKLRVLGYNHNGEW-N₂H₃ (207)–gereinigt

Bei dieser Thioestervorstufe sowie den Vorstufen **211-213** wurde an der Position IT das Pseudoprolin Dipeptid Fmoc-Ile-Thr(Ψ(Me,Me)Pro)-OH und an der Position AS das Fmoc-Ala-Ser(Ψ(Me,Me)Pro)-OH während der SPPS eingebaut. Das Peptid wurde im 25 µmol-Maßstab synthetisiert. Ausbeute: Abs.₂₇₈ = 0.205 (10 ml, 5.4 µmol, 22%, ϵ_{278} = 8'400 l · mol⁻¹ · cm⁻¹). UPLC: t_R = 2.80 min (Gradient: 3-90% B in 3 min). Reinheit_{UPLC278nm} = 98%. ESI-MS: 4184.32 m/z (dekonv.), MALDI/TOF-MS: 4185.5 m/z ([M+H]⁺), (C₁₉₀H₂₉₂N₅₂O₅₅, berechnet: 4184.66 g · mol⁻¹).

H-KNLFVALpYDFVASGDNTLSITKGEKLRVLGYNHNGEW-N₂H₃ (211)–gereinigt

Das Peptid wurde im 25 µmol-Maßstab synthetisiert. Ausbeute: Abs.₂₇₈ = 0.200 (10 ml, 2.6 µmol, 10%, ϵ_{278} = 7'660 l · mol⁻¹ · cm⁻¹). UPLC: t_R = 1.55 min (Gradient: 3-90% B in 2 min). Reinheit_{UPLC278nm} = 92%. ESI-MS: 4264.70 m/z (dekonv.), MALDI/TOF-MS: 4265.0 m/z ([M+H]⁺), (C₁₉₀H₂₉₃N₅₂O₅₈P₁, berechnet: 4264.65 g · mol⁻¹).

H-KNLFVALYDFVASGDNTLSITKGEKLRVLGpYNHNGEW-N₂H₃ (212)–gereinigt

Das Peptid wurde im 10 µmol-Maßstab synthetisiert. Ausbeute: Abs.₂₇₈ = 0.215 (2 ml, 0.561 µmol, 6%, ϵ_{278} = 7'660 l · mol⁻¹ · cm⁻¹). UPLC: t_R = 1.77 min (Gradient: 3-90% B in 2 min). Reinheit_{UPLC278nm} = 92%. ESI-MS: 4264.22 m/z (dekonv.), MALDI/TOF-MS: 4265.2 m/z ([M+H]⁺), (C₁₉₀H₂₉₃N₅₂O₅₈P₁, berechnet: 4264.65 g · mol⁻¹).

H-KNLFVALpYDFVASGDNTLSITKGEKLRVLGpYNHNGEW-N₂H₃ (213)–gereinigt

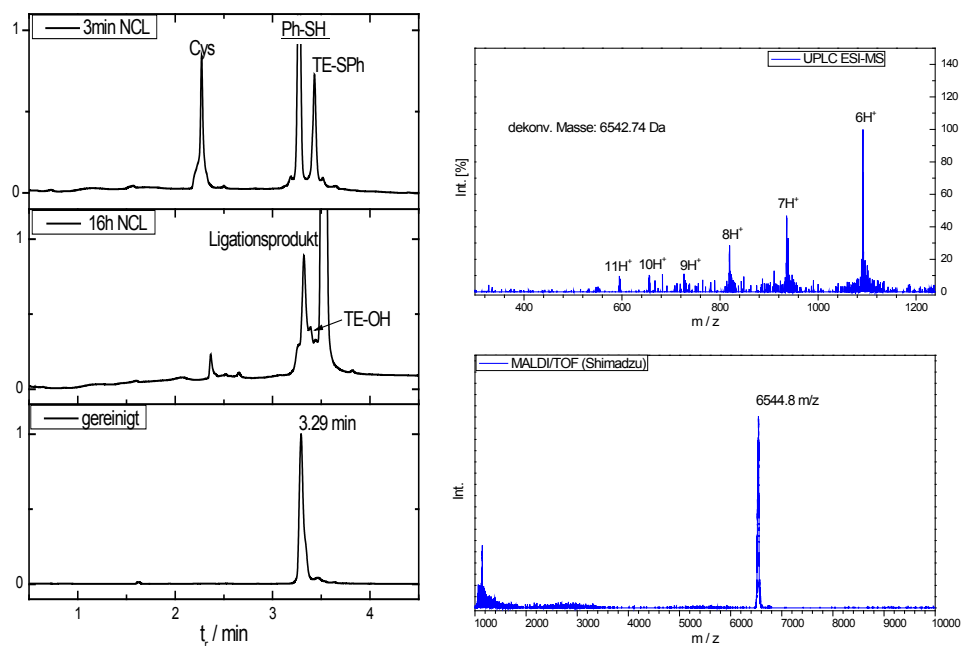
Das Peptid wurde im 50 µmol-Maßstab synthetisiert. Ausbeute: Abs.₂₇₈ = 0.268 (20-fache Verdünnung 2 ml, 15.5 µmol, 31%, ϵ_{278} = 6'920 l · mol⁻¹ · cm⁻¹). UPLC: t_R = 1.70 min (Gradient: 3-90% B in 2 min). Reinheit_{UPLC278nm} = 93%. ESI-MS: 4344.24 m/z (dekonv.), MALDI/TOF-MS: 4344.9 m/z ([M+H]⁺), (C₁₉₀H₂₉₄N₅₂O₆₁P₂, berechnet: 4344.63 g · mol⁻¹).

Vergleichende Synthese der Abl-(Phospho)SH3-Domänen durch NCL in Lösung

1.2 Äquivalente der Peptidhydrazide (**207**, **211-213**) wurden in dem Puffer (0.2 M NaH_2PO_4 , 6 M GdmCl, pH 3,7) gelöst, sodass sich eine 2 mM Lösung ergab. Es wurde bei $-10\text{ }^\circ\text{C}$ unter starkem Rühren 10 vol.% Oxidationslösung (0.2 M NaNO_2 in H_2O) hinzugegeben. Die Mischung wurde 20-80 min gerührt. Die Vollständigkeit der Azid-Generierung wurde durch Zugabe des thiolhaltigen Ligationspuffer 3 und 20 mM TCEP Lösung (1:1) im HPLC-Probengefäß geprüft. Bei vollständiger Umsetzung zum Azid wurde sofort nach Behandlung mit obiger Mischung, in der UPLC der entsprechende Thiophenol- oder MPAA-Thioester quantitativ nachgewiesen. Bei unvollständigen Umsatz kann noch Hydrazid beobachtet werden. Wenn die Reaktion nicht frühzeitig abgebrochen, die Temperatur über 0°C erhöht oder die Lösung länger mit TCEP behandelt wurde, konnten keine größeren Mengen Peptidsäure beobachtet werden. Nach vollständigen Umsatz zum Azid, wurde das gleiche Volumen an thiolhaltigen Ligationspuffer 3 bei 0°C hinzugegeben, wodurch ein pH-Wert von 5 resultierte. Durch gezielte Zugabe von Natronlauge bei 0°C , wurde der pH-Wert auf 7 eingestellt. Danach wurde ein Äquivalent des Cysteinylpeptids (**175**, **176**) in geringem Volumen Ligationspuffer 3 gelöst und zu dem frisch generierten Thioester gegeben. Das Ende der Reaktion wurde durch UPLC-Analyse mit vorheriger Zugabe von TCEP geprüft. Das Reaktionsgemisch wurde 16-24 Stunden lang gewirbelt, bis kein Cysteinylpeptid mehr beobachtet werden konnte. Die Reinigung des gewünschten Produkts erfolgte mittels semi-präparativer HPLC. Es wurde dem Ligationspuffer vor der Reinigung 2 Äquivalente TCEP bezogen auf die Thioestervorstufe zugesetzt. Dem der pH-Wert der Reaktionsmischung darf vor der Reinigung nicht unter 5 erniedrigt werden, da sonst wieder Oxidation stattfinden kann.

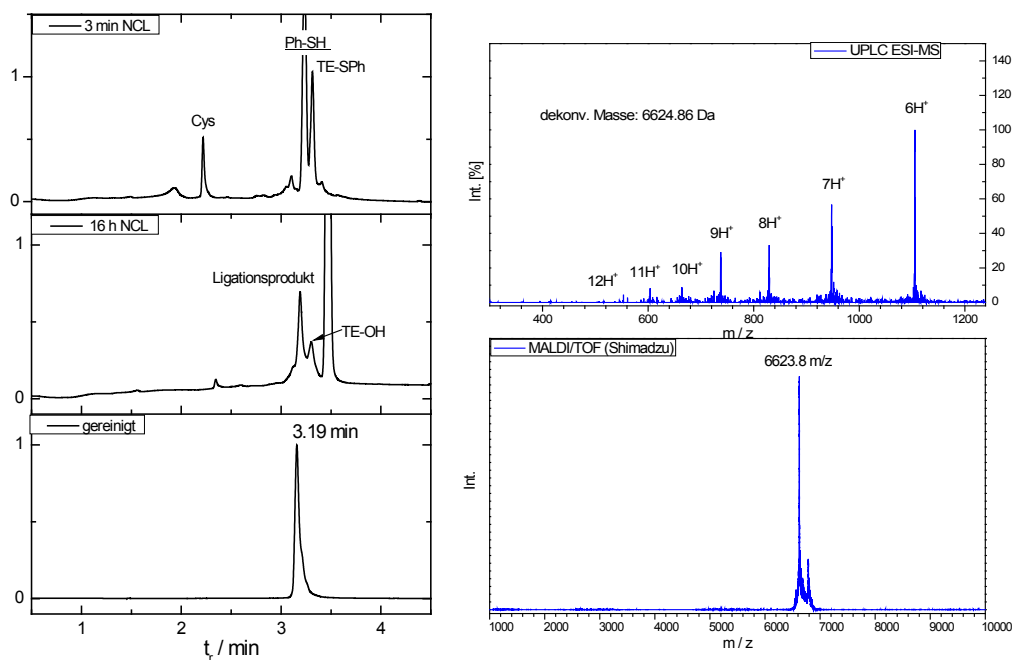
H-K-NLFVALYDFVASGDNTLSITKGEKLRVLGYNHNGEWCEAQTKNGQGW-VPSNYITPVNßAla- N_2H_3 (**210**)

Die Domäne wurde im 700 nmol Maßstab synthetisiert. Es wurde Thiophenol im Ligationspuffer 3 verwendet. Ausbeute: $\text{Abs}_{278} = 0.435$ (0.5 ml, 144 nmol, 18%, $\epsilon_{278} = 15'400\text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). UPLC: $t_R = 3.29\text{ min}$ (Gradient: 3-60% B in 4 min). Reinheit $_{\text{UPLC}278\text{nm}} = 93\%$. ESI-MS: 6542.74 m/z (dekonv.), MALDI/TOF-MS: 6644.8 m/z ($[\text{M}+\text{H}]^+$), ($\text{C}_{293}\text{H}_{447}\text{N}_{81}\text{O}_{88}\text{S}_1$, berechnet: 6544.23 g \cdot mol $^{-1}$).



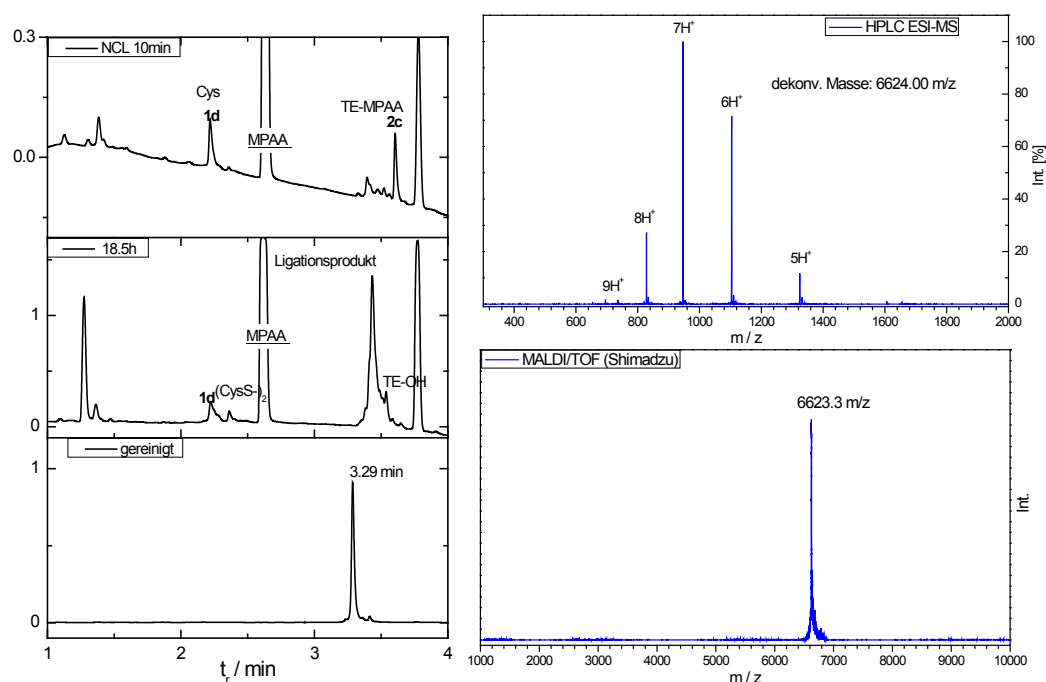
H-K-NLFVAL^pYDFVASGDNTLSITKGEKLRVLGYNHNGEWCEAQTKNGQGW-VPSNYITPVNBAla-N₂H₃ (214)

Die Domäne wurde im 700 nmol Maßstab synthetisiert. Es wurde Thiophenol im Ligationspuffer 3 verwendet. Ausbeute: Abs.₂₇₈ = 0.435 (0.5 ml, 144 nmol, 18%, ϵ_{278} = 14'660 l · mol⁻¹ · cm⁻¹). UPLC: t_R = 3.29 min (Gradient: 3-60% B in 4 min). Reinheit_{UPLC278nm} = 99%. ESI-MS: 6624.00 m/z (dekonv.), MALDI/TOF-MS: 6623.9 m/z ([M+H]⁺), (C₂₉₃H₄₄₈N₈₁O₉₁S₁P₁, berechnet: 6624.22 g · mol⁻¹).

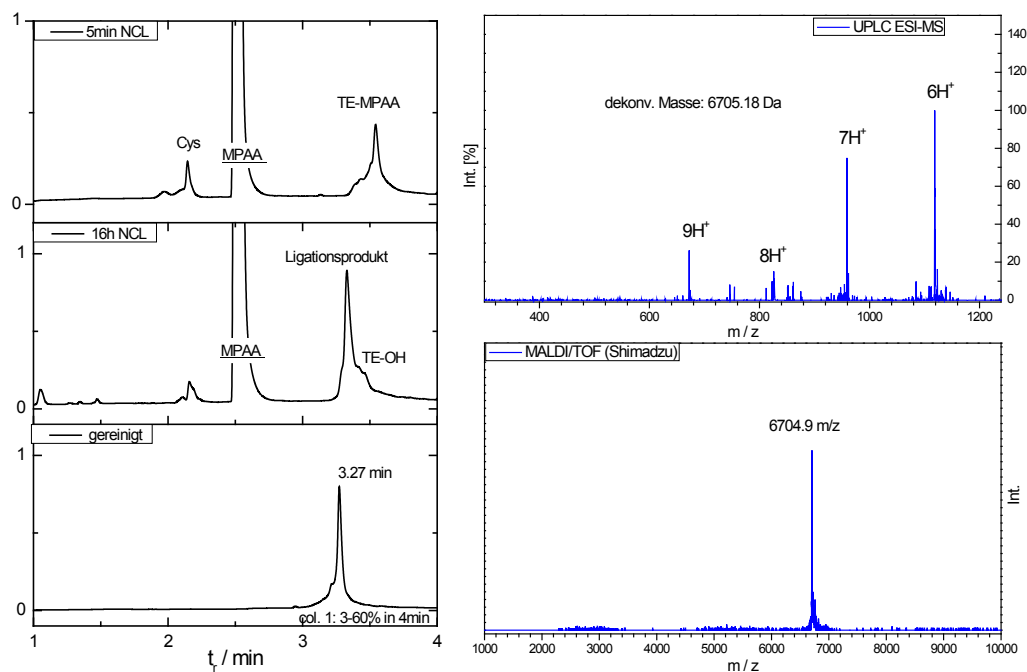


H-K-NLFVALYDFVASGDNTLSITKGEKLRVLGYNHNGEWCEAQTKNGQGW-VPSNpYITPVNBAla-N₂H₃ (215)

Die Domäne wurde im 100 nmol Maßstab synthetisiert. Es wurde MPAA im Ligationspuffer 3 verwendet. Ausbeute: $\text{Abs}_{278} = 0.201$ (0.2 ml, 27 nmol, 27%, $\epsilon_{278} = 14'660 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). UPLC: $t_R = 3.29 \text{ min}$ (Gradient: 3-60% B in 4 min). Reinheit $_{\text{UPLC}278\text{nm}} = 95\%$. ESI-MS: 6623.95 m/z (dekonv.), MALDI/TOF-MS: 6623.3 m/z ($[\text{M}+\text{H}]^+$), ($\text{C}_{293}\text{H}_{448}\text{N}_{81}\text{O}_{91}\text{S}_1\text{P}_1$, berechnet: 6624.22 g · mol⁻¹).

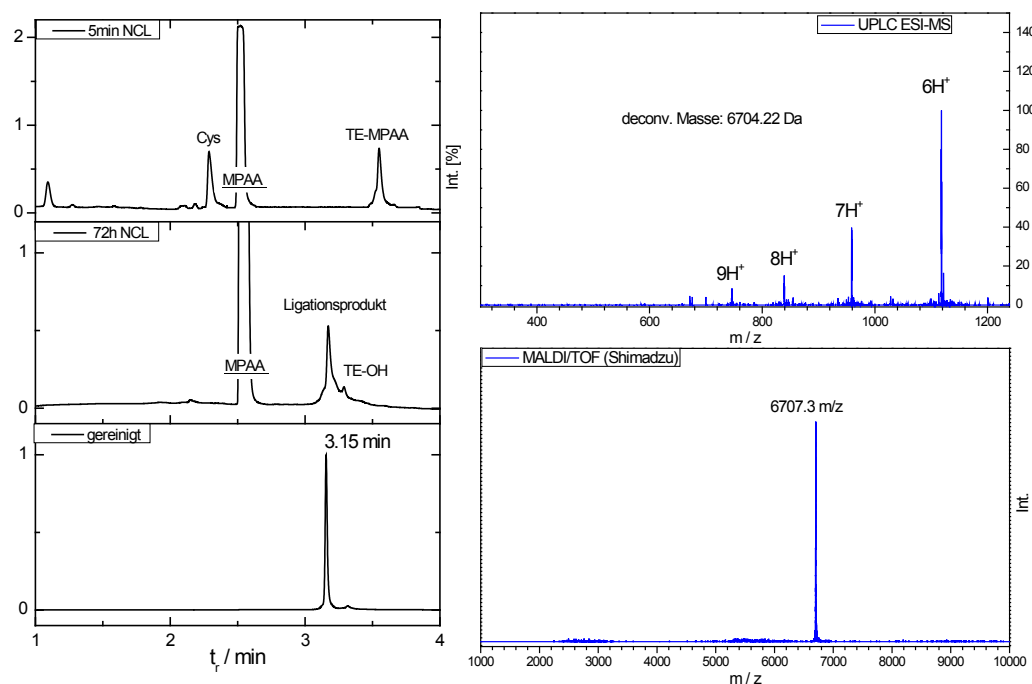

H-K-NLFVALYDFVASGDNTLSITKGEKLRVLGpYNHNGEWCEAQTKNGQGW-VPSNpYITPVNBAla-N₂H₃ (216)

Die Domäne wurde im 100 nmol Maßstab synthetisiert. Es wurde MPAA im Ligationspuffer 3 verwendet. Ausbeute: $\text{Abs}_{278} = 0.201$ (0.2 ml, 29 nmol, 29%, $\epsilon_{278} = 13'920 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). UPLC: $t_R = 3.27 \text{ min}$ (Gradient: 3-60% B in 4 min). Reinheit $_{\text{UPLC}278\text{nm}} = 85\%$. ESI-MS: 6705.18 m/z (dekonv.), MALDI/TOF-MS: 6704.9 m/z ($[\text{M}+\text{H}]^+$), ($\text{C}_{293}\text{H}_{448}\text{N}_{81}\text{O}_{91}\text{S}_1\text{P}_1$, berechnet: 6704.20 g · mol⁻¹).



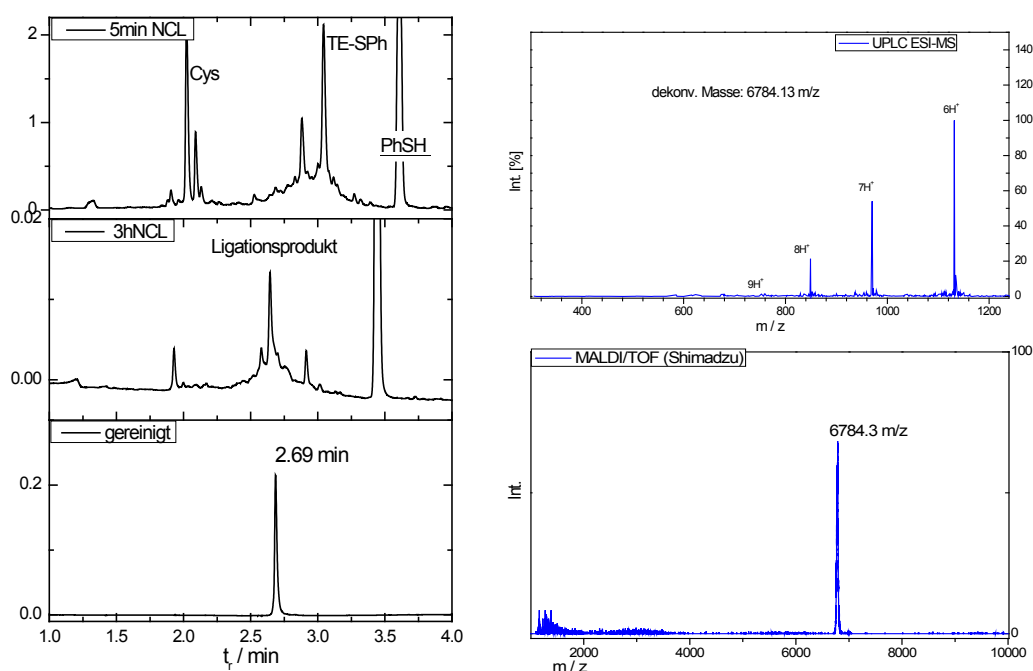
H-K-NLFVALpYDFVASGDNTLSITKGEKLRVLGYNHNGEWCEAQTKNQGW-VPSNpYITPVNBIa-N₂H₃ (217)

Die Domäne wurde im 100 nmol Maßstab synthetisiert. Es wurde MPAA im Ligationspuffer 3 verwendet. Ausbeute: Abs.₂₇₈ = 0.250 (0.2 ml, 38 nmol, 38%, ϵ_{278} = 13'920 l · mol⁻¹ · cm⁻¹). UPLC: t_R = 3.15 min (Gradient: 3-60% B in 4 min). Reinheit_{UPLC278nm} = 85%. ESI-MS: 6704.22 m/z (dekonv.), MALDI/TOF-MS: 6707.3 m/z ([M+H]⁺), (C₂₉₃H₄₄₈N₈₁O₉₁S₁P₁, berechnet: 6704.20 g · mol⁻¹).



H-K-NLFVAL**p**YDFVASGDNTLSITKGEKLRVLG**p**YNHNGEWCEAQTKNGQGW-VPSN**p**YITPVNBAla-N₂H₃ (**218**)

Die Domäne wurde im 600 nmol Maßstab synthetisiert. Es wurde MPAA im Ligationpuffer 3 verwendet. Ausbeute: Abs.₂₇₈ = 0.290 (1 ml, 220 nmol, 22%, $\epsilon_{278} = 13'150 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). UPLC: $t_R = 3.15 \text{ min}$ (Gradient: 3-60% B in 4 min). Reinheit_{UPLC278nm} = 85%. ESI-MS: 6784.13 m/z (dekonv.), MALDI/TOF-MS: 6784.3 m/z ($[M+H]^+$), ($C_{293}H_{450}N_{81}O_{97}S_1P_3$, berechnet: 6784.18 g · mol⁻¹).



Überprüfung der Bindungsaffinitäten durch Fluoreszenzpolarisation und Tryptophan-Emission in Lösung.

Die Fluoreszenzpolarisation mit den FAM-markierten Bindern (3BP1 **203**, 2BP2 **204**, p41 **205** und ID **206**) und synthetischen Domänen (**210**, **214-217**) in Lösung wurde wie in Abschnitt 6.6.9 (Seite 169) beschrieben durchgeführt. Die erhaltenen Bindungsisothermen sind im Anhang zu finden.

Die Bindungsaffinitäten wurden weiterhin durch Tryptophan-Emission überprüft. Die Titration erfolgte mit steigenden Konzentrationen von markierungsfreien Liganden (3BP1' **219**, ID' **220**) welche zu den Abl-(Phospho)SH3-Domänen (**210**, **214**) gegeben wurde. Die Domänen-Konzentration (2 μM) war im PBS-Puffer konstant. Die Ligandenkonzentration wurde durch Titration von 0 - 348 μM erhöht. Die Liganden waren in PBS-Puffer gelöst, dem ebenfalls 2 μM SH3-Domäne hinzugefügt wurde, um Verdünnungseffekte zu vermeiden. Nach jeder Zugabe des Liganden wurde die Lösung

2 min geschüttelt, um zu äquilibrieren. Die Fluoreszenz wurde unter Verwendung eines *Varian Cary-Eclipse*-Spektrometers gemessen, das mit einem Thermostat ausgerüstet war. Die Küvetten wurden bei 25°C gehalten. Die Anregungswellenlänge war bei Verwendung des 3BP1'-Liganden $\lambda_{\text{ex.}} = 300$ nm und bei Verwendung von ID' $\lambda_{\text{ex.}} = 305$ nm (um Fluoreszenzemission von Tyrosin in dem Liganden zu verhindern, Extinktions-Schlitzbreite 10 nm). Die Emission wurde von 315 bis 500 nm mit einer Schlitzbreite von 10 nm gemessen. Aus zwei Fluoreszenzspektren wurden ein gemitteltes Spektrum berechnet. Die Datenpunkte der Fluoreszenzintensität bei $\lambda = 349$ nm (Fluoreszenzmaximum bei der Liganden-Konzentration 0 μM) wurden durch nichtlineare hyperbolische Regression an Gl. 2 (Seite 68) angenähert. Die Fluoreszenzspektren und Bindungsisothermen mit entsprechenden Dissoziationskonstanten (K_D) sind in Abschnitt 10.3 auf Seite 243 dargestellt.

H-APT MPPPLPP-NH₂ (219)

Das Peptid wurde im 10 μmol -Maßstab synthetisiert. Ausbeute: 5 mg (4.42 μmol , 44%). UPLC: $t_R = 1.44$ min (Gradient: 3-90% B in 2 min). Reinheit_{UPLC278nm} = 99%. ESI-MS: 1015.90 m/z (dekonv.), MALDI/TOF-MS: 1017.0 m/z ($[\text{M}+\text{H}]^+$), ($\text{C}_{48}\text{H}_{77}\text{N}_{11}\text{O}_{11}\text{S}_1$, berechnet: 1016.25 g · mol⁻¹).

H-PAPKR NKPTVYGVSPNY-NH₂ (220)

Das Peptid wurde im 10 μmol -Maßstab synthetisiert. Ausbeute: Abs.₂₇₈ = 0.204 (5 ml, 8.4 μmol , 84%, $\epsilon_{278} = 2800$ L · mol⁻¹ · cm⁻¹). Reinheit_{UPLC278nm} = 99%. ESI-MS: 1886.96 m/z (dekonv.), MALDI/TOF-MS: 1888.8 m/z ($[\text{M}+\text{H}]^+$), ($\text{C}_{86}\text{H}_{135}\text{N}_{25}\text{O}_{23}$, berechnet: 1887.15 g · mol⁻¹).

6.10 Experimentelle Vorschriften zu Unterkapitel 4.7

Die NMR-Messungen der verschiedenen Domänen wurden durch *Dr. Andre Dallmann* an einem *Avance II 500* (500 MHz) NMR-Spektrometer der Firma *Bruker* in PBS-Puffer/D₂O (95:5) bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Messungen wurden, wenn nicht anderes angegeben in *Shigemi*-Rohren durchgeführt, um ein kleines Volumen von 250 μl verwenden zu können.

Messungen zur Ermittlung der Schmelzkurven der Abl-(Phospho)SH3-Domäne

Die Messungen zur Ermittlung der Schmelzkurven wurden bei unterschiedlichen Temperaturen in NMR-Rohren in einem Volumen von 600 μl durchgeführt. Die

Messungen begannen bei 288 K (15°C), die Temperatur der Rohre wurden innerhalb von je 5 min um je 5 K angehoben. Die ^1H -Spektren dieser Messreihe wurden mit 128 Aufnahmen (*scans*) durchgeführt. Nach Erreichen der Maximaltemperatur von 343 K (70°C) wurden die Rohre über einen Zeitraum von 30 min langsam auf Raumtemperatur abgekühlt, wonach ebenfalls ein ^1H -NMR-Spektrum aufgenommen wurde. Die Spektren sind in Abbildung 4.25 (Seite 106) sowie in Abbildung 6.6 und Abbildung 6.7 zu finden. Die anschließende Auswertung erfolgte wie in Abschnitt 4.7.2 (Seite 104) beschrieben.

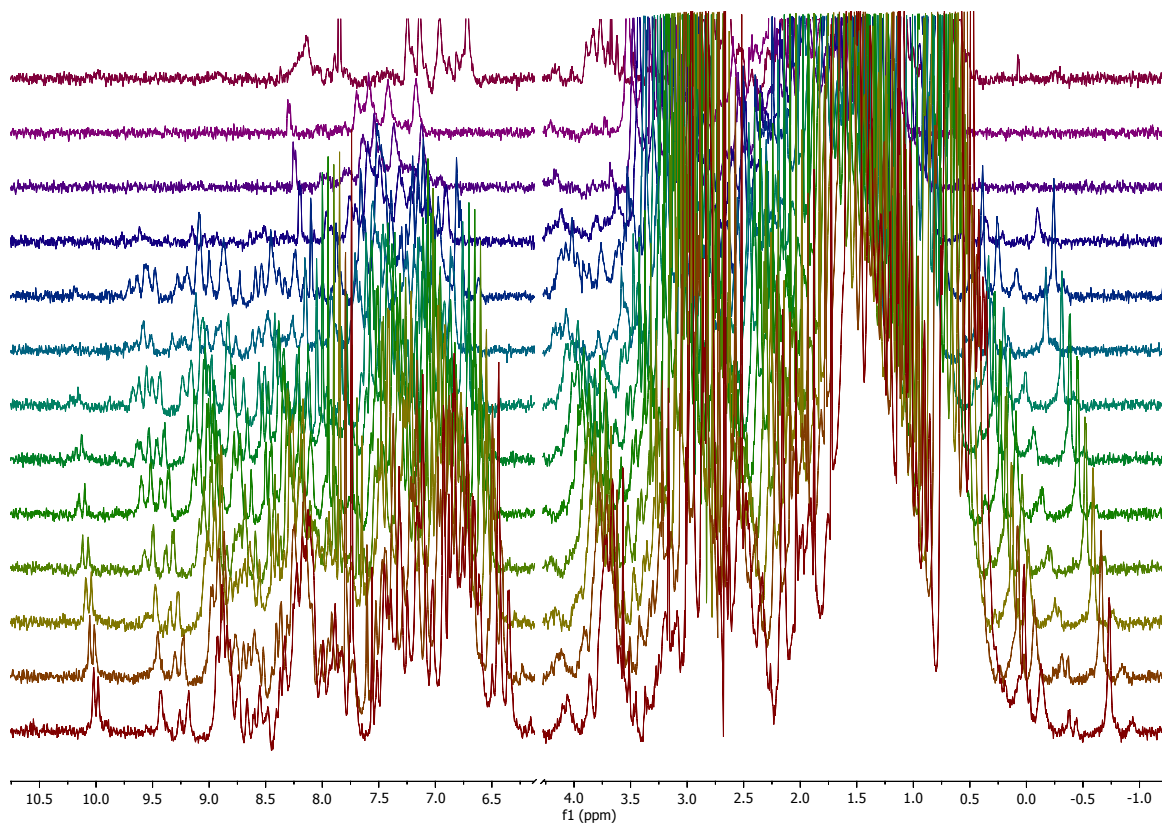


Abbildung 6.6: ^1H -NMR Spektren der unphosphorylierten Abl-SH3-Domäne bei unterschiedlichen Temperaturen.

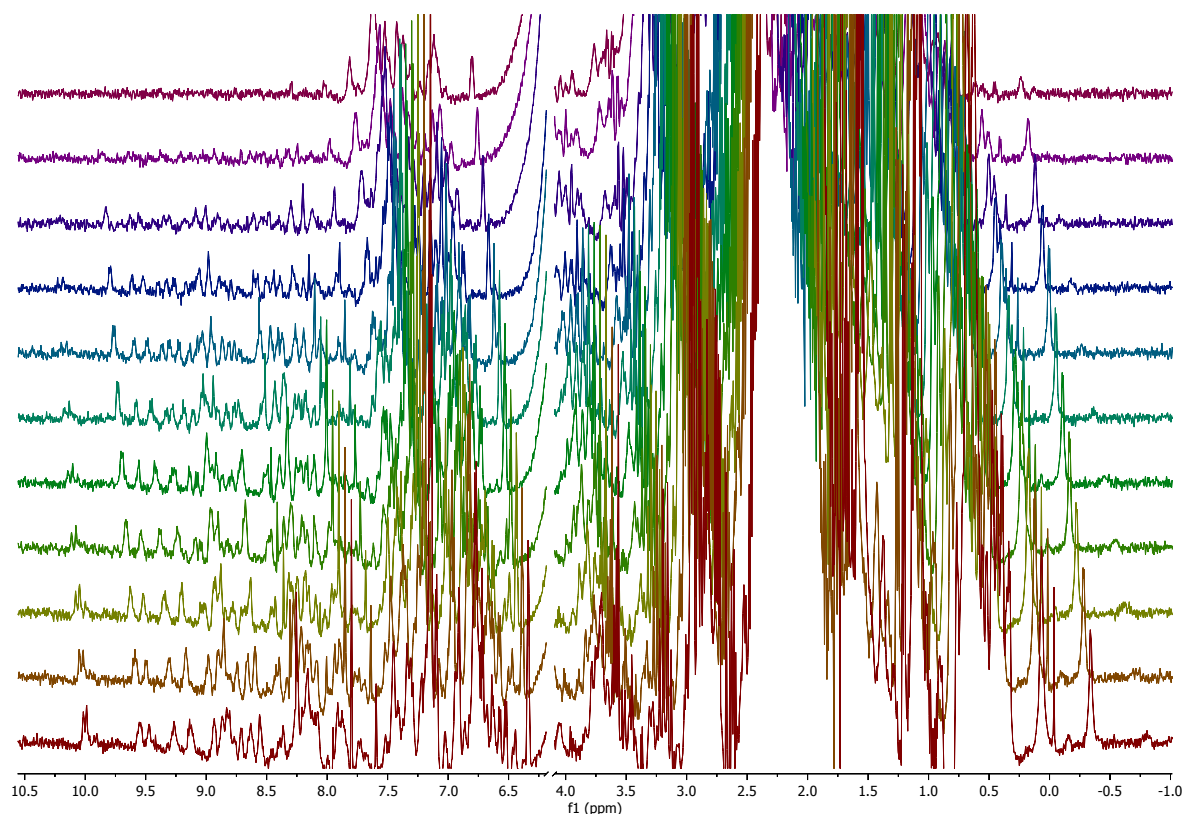


Abbildung 6.7: ^1H -NMR Spektren der pY⁷ Abl-SH3-Domäne bei unterschiedlichen Temperaturen.

Messungen zur Ermittlung der Ligandeninteraktion

Es wurde jeweils die Abl Y⁷Y³⁰Y⁵² **210** und pY⁷ **214** SH3-Domäne in 137 μM Konzentration im *Shigem*-Rohr vorgelegt und entweder der unmarkierte Ligand 3BP1⁴ **219** oder ID⁴ **220** hinzugegeben. Die Ligandenkonzentration wurde dabei von 0 auf bis zu 1'096 μM (8 Äquivalente) erhöht. Bei der unphosphorylierten Domäne **210** wurde jeweils ein ^1H -NMR Spektrum pro Titrationspunkt aufgenommen. Bei der Y⁷ phosphorylierten Domäne **214** wurde zusätzlich ein ^{31}P -NMR Spektrum aufgenommen. Die Spektren sind in Abbildung 4.26 (Seite 109) zu sehen. Mit den Verschiebungswerten bei unterschiedlicher Konzentration der Binder wurden Bindungsisotherme über hyperbole Regression mit Gl. 2 (Seite 68) bestimmt die im Anhang 10.3 auf Seite 245 dargestellt sind.

6.11 Experimentelle Vorschriften zu Unterkapitel 4.8

Die Agarosekugeln **126** wurden wie in Abschnitt 6.6.3 (Seite 160) beschrieben hergestellt. Die Peptidhydrazid-Immobilisierung erfolgte ebenfalls wie in Abschnitt 6.6.3 beschrieben über zwei Stunden. Nach dieser Zeit waren die Peptidhydrazide nicht mehr im Überstand nachweisbar (UPLC-MS). Anschließend wurde der Überstand entfernt

und es wurde eine Lösung von 50 mM NaCNBH₃ zu den Sphären gegeben. Nach 80-minütigen Schütteln zeigte der Überstand keine Abtrennung des peptidischen Materials an. Die Kugeln wurden gewaschen (5x Wasser, 5x 8 M Harnstoff-Lösung, 5x Wasser).

Bindungsfähigkeitsmessung mittels Fluorimetrie

Die mit den Domänen beladenen Agarosekugeln **223** und **224** wurden 30 min lang mit einer Lösung des FAM-markierten 3BP2 Peptid **204** (100 µM) in PBS-Puffer inkubiert. Anschließend wurde der Überstand entfernt und mit PBS gewaschen (5 ml, 3x je 1 ml). Es wurde jeweils von jeder Waschlösung das Fluoreszenzspektrum an dem *Cary Eclipse* Fluoreszenzspektrometer aufgenommen. Erreichte das Fluoreszenzmaximum das maximale Aufnahmevermögen des Gerätes wurde entsprechend verdünnt und die Verdünnung in die Fluoreszenzintensität mit eingerechnet (Verdünnungsfaktor). Anschließend wurden die Agarose-Kugeln mit SDS-Puffer bei 85°C für 5 min geschüttelt. Der Überstand wurde von den Agarose-Kugeln getrennt und es wurde wie oben beschrieben die Fluoreszenz bestimmt. Die gemessenen Wert sind in Abbildung 4.27 (Seite 114) zu finden.

Bindungsfähigkeitsmessung mittels UPLC-MS

Die mit den Domänen beladenen Agarosekugeln **223** und **224** wurden 30 min lang mit 650 µl einer Lösung des FAM-markierten 3BP2 Peptid **204** und des p41 Peptids **205** (100 µM) in PBS-Puffer inkubiert. Der Überstand wurde zu Beginn mittels UPLC-MS gemessen. Es wurde nach 30 min der Überstand verworfen und mit 500 µl und zweimal 1 ml PBS-Puffer gewaschen. Die Waschlösungen wurden ebenfalls durch die UPLC-MS analysiert. Anschließend wurde 250 µl einer 8 M Harnstofflösung auf die Agarosekugeln gegeben und es wurde 10 min geschüttelt. Danach wurde erneut ein UPLC-MS-Analyse durchgeführt. Die Chromatogramme sind in Abbildung 4.28 (Seite 115) dargestellt.

6.11.1 Pulldown-Experiment mit K562-Zelllysate

Die K562-Zellen wurden vom Arbeitskreis *Prof. Christine Sers*, AG Molekulare Tumorphathologie/ Tumorsystembiologie, *Charité Mitte* erhalten. Sie wurden in *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) mit 10 vol.% fetalem Kälberserum und Penicillin-Streptomycin von *Dr. Christina Kuznia* kultiviert. 2 Millionen Zellen wurden herunter-zentrifugiert und gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet in 350 µl eiskalten Zellaufschluss-Puffer aufgenommen und über 30 min auf Eis aufgeschlossen. Hinweis: Bei Verwendung eines Puffers, der statt 25 mM Tris 10 mM HEPES beinhaltet wurde kein

zufriedenstellender Zellaufschluss beobachtet. Alle 5 Minuten wurde stark geschüttelt. Der Erfolg des quantitativen Zellaufschlusses wurde mittels Mikroskop überprüft. Anschließend wurde die Proteinkonzentration mit Hilfe des Bradford-Tests^[276] und Plattenlesegerät zu 1.9 mg/ml bestimmt.

In vier kleinen Spritzenreaktoren wurden je 40 µl der Agarose-Kugel als Duplikat transferiert auf denen die Y⁷Y³⁰Y⁵²-SH3-Domäne **223** und pY⁷-SH3-Domäne **224** immobilisiert waren. Anschließend wurden diese in 200 µl PBS suspendiert und die Reaktoren wurden 30 min geschüttelt, um eine Domänen-Faltung zu begünstigen. Die Kugeln wurden dreimal mit Wasser und dreimal mit 200 µl Aufschluss-Puffer gewaschen. Anschließend wurde der Zellaufschluss zu den Kugeln gegeben (80 µl pro Reaktor). Diese Suspension wurde über Nacht bei 4°C geschüttelt (16 h). Am nächsten Morgen wurde der Überstand entfernt und es wurde mit 200 µl PBS und mit 200 µl Aufschluss-Puffer gewaschen. Anschließend wurde mit Aufschlusspuffer (200 µl) ohne Detergenz gewaschen. Dann wurde je 30 µl SDS-Probepuffer (95°C) hinzugegeben und die Reaktoren bei 95°C über 10 min geschüttelt. Danach wurde 5 Minuten zentrifugiert, um das Eluat zu erhalten.

Alle folgenden Schritte wurden im Arbeitskreis *Dr. Eberhard Krause* am *Leibniz-Institut für molekulare Pharmakologie* (FMP-Berlin/Buch) durchgeführt. Das Eluat wurde auf ein SDS-PAGE-Gel (5% *Stacking* und 10% Laufgel, Färbung: Coomassie) aufgetragen. Die Gel-Elektrophorese wurde bei 200 V durchgeführt. Diese Arbeiten wurden zusammen mit *Annika Manns* durchgeführt. Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die Gele mit einer Lösung aus 40 vol.% Methanol und 10 vol.% Essigsäure über 30 min fixiert. Die Färbung der Proteine erfolgt über Nacht mittels kolloidaler Coomassie-Färbelösung: (0.1% ma.% Coomassie G-250, 34% vol.% Methanol, 1.3 M Ammoniumsulfat und 0.3 M Phosphorsäure). Aus den erhaltenen 4 Banden wurden jeweils 15 Banden gleichmäßig mit einer Rasierklinge ausgeschnitten (Abbildung 6.8). Die 60 Proben wurden weiter zerkleinert und in Plastikgefäße überführt. Das Gel wurde entfärbt und porös gemacht durch zweimalige Behandlung mit ACN, nachdem jeweils der Überstand entfernt wurde. Anschließend wurde 100 µl einer Trypsin (*Promega*, Mannheim) enthaltenden Lösung (3 µg Trypsin in 50 mM NH₄CO₃) hinzugegeben, um die Proteine wurden im Gel über Nacht (18 h) zu verdauen. Am nächsten Tag wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 µl 1 vol.% TFA-Lösung beendet (pH 2). Der Überstand wurde in ein zweites Probengefäß überführt, außerdem wurden die Gelteile mit ACN extrahiert. Nach Extraktion wurde die ACN-Lösung zu dem wässrigen Überstand gegeben und die Lösung wurde in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. In der Folge

wurde 10 µl Messlösung (5 vol.% ACN, 0.1 vol.% TFA in Wasser) hinzugegen und es wurden die LC-MS² Messungen durchgeführt. Die LC-MS² Messungen sowie die erste Auswertung der erhaltenen Daten wurde durch *Dr. Michael Schümann* ausgeführt.

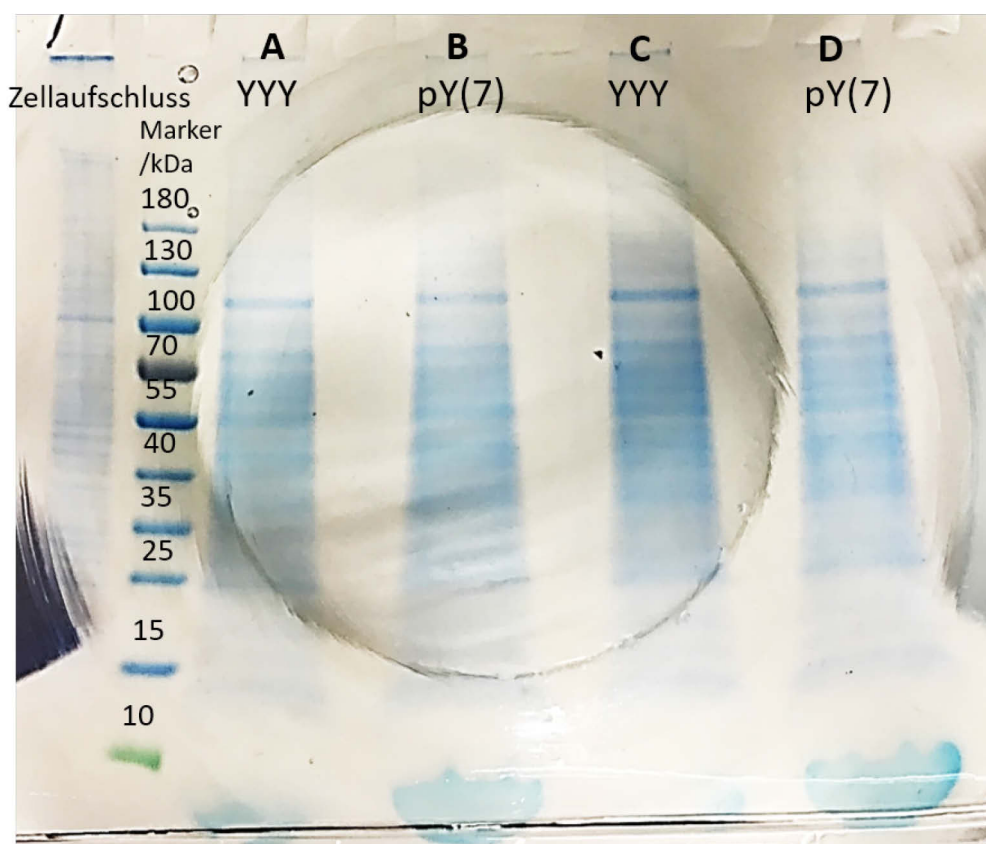


Abbildung 6.8: SDS-PAGE-Gel der vier Pulldowns A-D. Mit Proteingrößen-Marker in kDa sowie das K562-Zelllysat mit welchem die funktionalisierten Sphären inkubiert wurden.

Auswertung: MaxQuant Version 1.5.2., mit LFQ

Database: UniProt Human_2015jul.fasta including contaminants

(s. MaxQuant.org) and GST

Human_2015mar.fasta: (147'854 sequences; 46'761'785 residues)

Enzyme: Trypsin/P

Max Missed Cleavages: 2

Variable modifications: Oxidation (M), Propionamide (C), Acetyl (Protein N-term)

Main Search use individual peptide mass Tolerances: True

Fragment Mass Tolerance: ± 0.35 Da

Match between runs: False

Protein FDR: 0.01

Peptide FDR: 0.01

Min. Razor-Peptides: 2, Min. uniq. Pep.: 1

Probe A: unphosphorylierte Abl-SH3-Domäne Y⁷Y³⁰Y⁵² **223**, Duplikat 1

Probe B: phosphorylierte Abl-SH3-Domäne pY⁷ **224**, Duplikat 1

Probe C: unphosphorylierte Abl-SH3-Domäne Y⁷Y³⁰Y⁵² **223**, Duplikat 2

Probe D: phosphorylierte Abl-SH3-Domäne pY⁷ **224**, Duplikat 2

Insgesamt wurden 3'428 Proteingruppen identifiziert. Diese sind in den Pulldowns durch mindestens 2 *Razor*- oder ein *Unique*-Peptiden (als Summe in allen vier Proben) zugeordnet worden. *Razor*-Peptide sind Peptide von denen Sequenzhomologe in mehr als zwei Proteinen bekannt sind. *Unique*-Peptide sind einzigartige Sequenzen für ein bestimmtes Protein. Es wurden durch zwei Methoden Proteine ermittelt die als spezifisch durch die phosphorylierte oder durch die nicht phosphorylierte SH3-Domäne angereichert angenommen werden. Für die Quantifizierung der Proteinmengen wurden die durch die MaxQuant-Software bestimmten LFQ-Werte verwendet. Für eine Proteinzuordnung zu der phosphorylierten oder unphosphorylierten Domänen mussten die folgenden Bedingungen erfüllt werden: (1.) Die LFQ-Verhältnisse beider Duplikate zur jeweils anderen Probe müssen größer oder gleich 2 sein. Zum Beispiel für die phosphorylierte SH3-Domäne ($\text{LFQ}_{(B)}/\text{LFQ}_{(A)} \geq 2$, $\text{LFQ}_{(D)}/\text{LFQ}_{(C)} \geq 2$). (2.) Als weitere Bedingung musste die Summe der *Razor*- und *Unique*-Peptide in beiden Duplikaten mindestens zwei sein. Entsprechend dieser Bedingungen, wurden 13 Proteine als durch die phosphorylierte Domäne angereichert klassifiziert und sind in Tabelle A 2 (Seite 246) zu finden. Durch die unphosphorylierte SH3-Domäne wurden 47 Proteine nach dieser Methode angereichert (Tabelle A 1). Methodisch bedingt gibt es nicht für alle identifizierten Proteine LFQ-Werte. Dies gilt insbesondere für die Proteine, die ausschließlich in den Pulldowns einer SH3-Domäne gefunden wurden. Es könnte sich bei diesen Proteinen um Binder mit besonders hoher Affinität handeln. Daher wurde zusätzlich zu den LFQ-Werten das Verhältnis der Anzahl der identifizierten *Razor+Unique* Peptide (#Pep.) ausgewertet. Als spezifisch-erkannt wurden Proteine nach der #Pep-Methode klassifiziert, wenn die folgenden drei Bedingungen erfüllt waren: (1.) In beiden Duplikaten der pY⁷- oder Y⁷Y³⁰Y⁵²-Euate muss die Summe an *Razor*- und *Unique*-Peptiden mindestens 2 sein. (2.) Das Verhältnis der Anzahl der *razor*- und *unique*-Peptide zur Vergleichsprobe muss größer gleich zwei sein. Eine Peptidanzahl von Null in einer Protein-Fraktion wurden durch 0.01 ersetzt, um ein Verhältnis als ganze Hunderter zu erhalten. (3.) Die nicht-normierten Proteinintensitäten mussten im Verhältnis größer oder gleich zwei sein. Die über die Peptidanzahl (#Pep.) bestimmten Binder der phosphorylierte Domäne sind in ebenfalls in Tabelle A 1 und Tabelle A 2 zusammengefasst.

Es wurden 65 Proteine als durch die phosphorylierte SH3-Domäne angereichert und 22 durch die unphosphorylierte SH3-Domäne angereichert klassifiziert.

7. Abkürzungsverzeichnis

Die Aminosäuren wurden durch den üblicherweise verwendeten Einbuchstaben- bzw. den Dreibuchstabencode abgekürzt

a.u.	arbitrary unit
Abl.	<i>Abelson murine leukemia viral oncogene homolog</i> 1 oder 2, auch c-Abl
ABP1	<i>actin-binding protein</i>
Abs.	Absorption
ACN	Acetonitril
Ala.	Alaninpeptid
ALL	akuter lymphatischer Leukämie
Alloc	Allyloxycarbonyl
AM	Aminomethyl
Äq.	Äquivalente
AS	Aminosäure
Asc.	Ascorbat
ATP	Adenosintriphosphat
BCR	<i>breakpoint cluster region</i>
ber.	berechnet
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
BSA	Rinderalbumin, engl. <i>bovine serum albumin</i>
Bt	Biotin
CM	<i>ChemMatrix</i> resin
CML	chronische myeloische Leukämie
CuAAC	Kupfer katalysierte 1,3-dipolare Alkin-Azid-Cycloaddition
Cys	Cysteinylpeptid
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
dekonv.	dekonvoliert
DIEA	Diisopropylethylamin
DMAP	Dimethylaminopyridin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDT	Ethandithiol
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure
EIC	<i>extracted ion count</i>
EPL	<i>expressed protein ligation</i>
ESI	Elektrosprayionisation

<i>et al.</i>	lat.: <i>et alii</i> (dt.: und andere)
FAM.....	5/6-Carboxyfluorescein
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
FP	Fluoreszenzpolarisation
FPLC	<i>Fast protein liquid chromatography</i>
FTICR	Fourier Transformations Ionen Cyclotron Resonanz
GdmCl	Guanidiniumchlorid
ggü.....	gegenüber
Gl.....	Gleichung
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
HCTU	2-(6-Chloro-1H-benzotriazol-1-yl)-tetramethyluroniumhexafluorophosphat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HOBt	<i>N</i> -Hydroxybenzotriazol
HPLC	<i>high pressure liquid chromatography</i>
HRMS.....	<i>high resolution mass spectrometry</i>
HRP-SA	<i>horseradish peroxidase streptavidin</i> -Konjugat
ID	SH2-Kinase Interdomäne in der Abl-Tyrosinkinase
<i>in cis</i>	intramolekular
<i>in trans</i>	intermolekular
IPL	<i>intein-mediated expressed protein ligation</i>
LC.....	<i>liquid chromatography</i>
LFQ	<i>label-free quantification</i>
ma.%.....	Massenprozent
Mes.	2-Mercaptoethansulfonat
MesNa.....	2-Mercaptoethansulfonat-Natrium
Mg	Molekulargewicht
Mmt	Monomethoxytrityl
MPAA.....	4-Mercaptophenyllessigsäure
MS	Massenspektrometrie
Nbz	<i>N</i> -Acylbenzimidazol
NCL	native chemische Ligation
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriacetat
NMM	N-Methylmorpholin
NMP	N-Methyl-2-pyrrolidon
NMR.....	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NP-40.....	PEG-40 nonylphenoether
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PEG.....	Polyethylenglycol

PEGA	Polyethylenglycol-dimethylacrylamid
Pen.....	Penicillamin
Ph ⁺	Philadelphia Chromosom
Ph/Pr	Phenylisopropyl Schutzgruppe
PNA.....	<i>peptide nucleic acid</i>
Pra.....	L-Propargylglycin
PS	Polystyrol
PTM	posttranslationale Modifikation
PyBOP	benzotriazolyl-1-oxy-tripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate
RBR.....	<i>Roche Blocking Reagent</i>
Rt	Raumtemperatur
SDS.....	Natriumdodecylsulfat
SEA	Bis(2-sulfanylethyl)amido
SG.....	Schutzgruppe
SH2	<i>Src-homology 2</i>
SH3	<i>Src-homology 3</i>
SPOCC	<i>superpermeable organic combinatorial chemistry resin</i>
SPPS.....	<i>solid phase peptide synthesis</i>
SPR ...	Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (engl. surface plasmon resonance)
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TE	Peptidthioester
TFA	Trifluoressigsäure
TFE	2,2,2-Trifluorethanol, 2,2,2-Trifluoroethanol
THF	Tetrahydrofuran
THPTA.....	Tris(3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amin
TIS.....	Triisopropylsilan
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TMS.....	Trimethylsilyl
TNBS.....	2,4,6-Trinitrobenzensulfonsäure
t _r	Retentionszeit
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UPLC	ultra pressure liquid chromatography
VA-044.....	2,2'-Azobis[2-(2-imidazolin-2-yl)propan]dihydrochlorid
vol.%	Volumenprozent
ZL	Zyklisierungslinker

8. Literaturverzeichnis

- [1] a) International Human Genome Sequencing Consortium:; E. S. Lander, L. M. Linton, B. Birren, C. Nusbaum, M. C. Zody, J. Baldwin, K. Devon, K. Dewar, M. Doyle, *et al.*, *Nature* **2001**, *409*, 860-921; b) J. C. Venter, M. D. Adams, E. W. Myers, P. W. Li, R. J. Mural, G. G. Sutton, H. O. Smith, M. Yandell, C. A. Evans, R. A. Holt, *et al.*, *Science* **2001**, *291*, 1304-1351.
- [2] P. S. Schnable, D. Ware, R. S. Fulton, J. C. Stein, F. Wei, S. Pasternak, C. Liang, J. Zhang, L. Fulton, T. A. Graves, *et al.*, *Science* **2009**, *326*, 1112-1115.
- [3] S. Pitchiaya, L. A. Heinicke, T. C. Custer, N. G. Walter, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 3224-3265.
- [4] P. Horvatovich, E. K. Lundberg, Y. J. Chen, T. Y. Sung, F. He, E. C. Nice, R. J. Goode, S. Yu, S. Ranganathan, M. S. Baker, *et al.*, *J. Proteome Res.* **2015**, *14*, 3415-3431.
- [5] L. D. N. Selvan, A. H. Patil, V. Nanjappa, A. Radhakrishnan, *Nature* **2014**.
- [6] D. L. Black, *Annu. Rev. Biochem.* **2003**, *72*, 291-336.
- [7] Q. Pan, O. Shai, L. J. Lee, B. J. Frey, B. J. Blencowe, *Nat. Genet.* **2008**, *40*, 1413-1415.
- [8] M. Wilhelm, J. Schlegl, H. Hahne, A. M. Gholami, M. Lieberenz, B. Küster, M. M. Savitski, E. Ziegler, L. Butzmann, S. Gessulat, *et al.*, *Nature* **2014**, *509*, 582-587.
- [9] G. A. Khoury, R. C. Baliban, C. A. Floudas, *Scientific Reports* **2011**, *1*, 90.
- [10] P. Bork, L. J. Jensen, C. von Mering, A. K. Ramani, I. Lee, E. M. Marcotte, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2004**, *14*, 292-299.
- [11] A. Chatr-aryamontri, B.-J. Breitkreutz, R. Oughtred, L. Boucher, S. Heinicke, D. Chen, C. Stark, A. Breitkreutz, N. Kolas, L. O'Donnell, *et al.*, *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, D470-D478.
- [12] E. Phizicky, P. I. H. Bastiaens, H. Zhu, M. Snyder, S. Fields, *Nature* **2003**, *422*, 208-215.
- [13] K. Theofilatos, C. Dimitrakopoulos, S. Likothanassis, D. Klefogiannis, C. Moschopoulos, C. Alexakos, S. Papadimitriou, S. Mavroudi, *Artif. Intell. Rev.* **2013**, *42*, 427-443.
- [14] F. Festa, J. Steel, X. Bian, J. Labaer, *Proteomics* **2013**, *13*, 1381-1399.
- [15] J. Rush, A. Moritz, K. A. Lee, A. Guo, V. L. Goss, E. J. Spek, H. Zhang, X.-M. Zha, R. D. Polakiewicz, M. J. Comb, *Nat. Biotech.* **2005**, *23*, 94-101.
- [16] T. Kimmerlin, D. Seebach, *J. Peptide Res.* **2005**, *65*, 229-260.
- [17] a) M. T. Weinstock, M. T. Jacobsen, M. S. Kay, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2014**, *111*, 11679-11684; b) K. S. Kumar, S. N. Bavikar, L. Spasser, T. Moyal, S. Ohayon, A. Brik, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 6137-6141; c) M. Haj-Yahya, B. Fauvet, Y. Herman-Bachinsky, M. Hejjaoui, S. N. Bavikar, S. V. Karthikeyan, A. Ciechanover, H. A. Lashuel, A. Brik, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2013**, *110*, 17726-17731.
- [18] E. Fischer, E. Fourneau, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1901**, *34*, 2868-2877.
- [19] a) E. Fischer, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1903**, *36*, 2094-2106; b) E. Fischer, E. Otto, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1903**, *36*, 2106-2116.
- [20] T. Curtius, *Journal für Praktische Chemie* **1882**, *26*, 145-208.

- [21] V. du Vigneaud, C. Ressler, J. M. Swan, C. W. Roberts, P. G. Katsoyannis, *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, *76*, 3115-3121.
- [22] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149-&.
- [23] V. L. Tal'roze., G. V. Karpov., *Russian J. Phys. Chem.* **1968**, *42*, 1658-1664.
- [24] M. Yamashita., J. B. Fenn, *J. Phys. Chem.* **1984**, *88*, 4451-4459.
- [25] B. L. Karger, L. V. Berry, *Clinical chemistry* **1971**, *17*, 757-764.
- [26] a) L. A. Carpino, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 4427-4431; b) F. C. McKay, N. F. Albertson, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 4686-4690.
- [27] L. A. Carpino, G. Y. Han, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 5748-5749.
- [28] F. Garcia-Martin, F. Albericio., *Chemistry Today* **2008**, *26*, 29-34.
- [29] C. Hyde, T. Johnson, R. C. Sheppard, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1992**, 1573-1575.
- [30] L. Zhang, C. Goldammer, B. Henkel, F. Zühl, G. Panhaus, G. Jungs, E. Bayer, in *Innovation and Perspectives in Solid Phase Synthesis* (Ed.: R. Epton), Mayflower, Birmingham, **1994**, pp. 711-716.
- [31] a) J. C. Hendrix, K. J. Halverson, J. T. Jarrett, P. T. Lansbury, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 4517-4518; b) D. Seebach, A. Thaler, A. K. Beck, *Helv. Chim. Acta* **1989**, *72*, 857-867.
- [32] a) H. Becker, H.-W. Lucas, J. Maul, V. N. R. Pillai, H. Anzinger, M. Mutter, *Die Makromolekulare Chemie, Rapid Communications* **1982**, *3*, 217-223; b) H. Hellermann, H.-W. Lucas, J. Maul, V. N. R. Pillai, M. Mutter, *Die Makromolekulare Chemie* **1983**, *184*, 2603-2617; c) W. Rapp, L. Zhang, R. Häbich, E. Bayer, *Proceedings of the 20th European Peptide Symposium, 1989*.
- [33] J. Rademann, M. Grøtli, M. Meldal, K. Bock, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*.
- [34] F. Garcia-Martin, M. Quintanar-Audelo, Y. Garcia-Ramos, L. J. Cruz, C. Gravel, R. Furic, S. Cote, J. Tulla-Puche, F. Albericio, *J. Comb. Chem.* **2006**, *8*, 213-220.
- [35] S. Frutos, J. Tulla-Puche, F. Albericio, E. Giralt, *Int. J. Pept. Res. Ther.* **2007**, *13*, 221-227.
- [36] H. M. Yu, S. T. Chen, K. T. Wang, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 4781-4784.
- [37] D. Singer, T. Zauner, M. Genz, R. Hoffmann, T. Zuchner, *J. Pept. Sci.* **2010**, *16*, 358-363.
- [38] T. Johnson, M. Quibell, D. Owen, R. C. Sheppard, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1993**, 369-372.
- [39] C. Toniolo, G. M. Bonora, M. Mutter, V. N. R. Pillai, *Macromol. Chem. Phys.* **1981**, *182*, 2007-2014.
- [40] T. Haack, M. Mutter, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 1589-1592.
- [41] a) M. Mutter, A. Nefzi, T. Sato, X. Sun, F. Wahl, T. Wöhr, *Peptide Res.* **1995**, *8*, 145-153; b) T. Wöhr, F. Wahl, A. Nefzi, B. Rohwedder, T. Sato, X. C. Sun, M. Mutter, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9218-9227; c) P. White, J. W. Keyte, K. Bailey, G. Bloomberg, *J. Pept. Sci.* **2004**, *10*, 18-26.
- [42] Y. Sohma, T. Yoshiya, A. Taniguchi, T. Kimura, Y. Hayashi, Y. Kiso, *Peptide Science* **2007**, *88*, 253-262.

-
- [43] a) T. Yoshiya, A. Taniguchi, Y. Sohma, F. Fukao, S. Nakamura, N. Abe, N. Ito, M. Skwarczynski, T. Kimura, Y. Hayashi, *et al.*, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 1720-1730; b) A. Taniguchi, T. Yoshiya, N. Abe, F. Fukao, Y. Sohma, T. Kimura, Y. Hayashi, Y. Kiso, *J. Pept. Sci.* **2007**, *13*, 868-874.
- [44] T. Curtius, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1902**, *35*, 3226-3228.
- [45] J. Honzl, J. Rudinger, *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1961**, *26*, 2333-2344.
- [46] L. Y. Alfeeva, L. A. Andreeva, V. N. Nezavibat'ko, *Lett. Pept. Sci.*, *2*, 109-111.
- [47] a) H. Yajima, N. Fujii, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1980**, 115-116; b) H. Yajima, N. Fujii, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 5867-5871.
- [48] L. Moroder, G. Borin, F. Marchiori, E. Scoffone, *Biopolymers* **1973**, *12*, 477-492.
- [49] M. Schnolzer, S. B. H. Kent, *Science* **1992**, *256*, 221-225.
- [50] T. Wieland, E. Bokelmann, L. Bauer, H. U. Lang, H. Lau, *Liebigs Ann. Chem.* **1953**, *583*, 129-149.
- [51] P. Dawson, T. Muir, I. Clark-Lewis, S. Kent, *Science* **1994**, *266*, 776-779.
- [52] T. M. Hackeng, J. H. Griffin, P. E. Dawson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 10068-10073.
- [53] a) M. Villain, H. Gaertner, P. Botti, *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, *2003*, 3267-3272; b) B. Dang, T. Kubota, K. Mandal, F. Bezanilla, S. B. H. Kent, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 11911-11919.
- [54] a) E. C. Johnson, S. B. H. Kent, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6640-6646; b) P. E. Dawson, M. J. Churchill, M. R. Ghadiri, S. B. H. Kent, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 4325-4329.
- [55] UniProt Datenbank, <http://www.uniprot.org/statistics/Swiss-Prot>, 26.04.2016.
- [56] D. A. Erlanson, M. Chytil, G. L. Verdine, *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 981-991.
- [57] T. W. Muir, D. Sondhi, P. A. Cole, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1998**, *95*, 6705-6710.
- [58] T. C. Evans, J. Benner, M.-Q. Xu, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 3923-3926.
- [59] T. J. Tolbert, C.-H. Wong, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2171-2174.
- [60] a) K. Severinov, T. W. Muir, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 16205-16209; b) J. A. Camarero, T. W. Muir, in *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley & Sons, Inc., **2001**.
- [61] a) P. Kane, C. Yamashiro, D. Wolczyk, N. Neff, M. Goebel, T. Stevens, *Science* **1990**, *250*, 651-657; b) R. Hirata, Y. Ohsumi, A. Nakano, H. Kawasaki, K. Suzuki, Y. Anraku, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 6726-6733; c) Y. Shao, S. B. H. Kent, *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 187-194.
- [62] M. Q. Xu, F. B. Perler, *The EMBO Journal* **1996**, *15*, 5146-5153.
- [63] L. Berrade, J. A. Camarero, *Cell. Mol. Life. Sci.* **2009**, *66*, 3909-3922.
- [64] R. J. Payne, S. Ficht, W. A. Greenberg, C.-H. Wong, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 4411-4415.
- [65] a) Q. Wan, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 9248-9252; b) C. Haase, H. Rohde, O. Seitz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 6807-6810.
- [66] L. Z. Yan, P. E. Dawson, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 526-533.
- [67] D. Crich, A. Banerjee, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 10064-10065.

- [68] L. R. Malins, K. M. Cergol, R. J. Payne, *ChemBioChem* **2013**, *14*, 559-563.
- [69] Z. Harpaz, P. Siman, K. S. A. Kumar, A. Brik, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 1232-1235.
- [70] R. E. Thompson, B. Chan, L. Radom, K. A. Jolliffe, R. J. Payne, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 9723-9727.
- [71] J. Chen, Q. Wan, Y. Yuan, J. Zhu, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8521-8524.
- [72] R. Yang, K. K. Pasunooti, F. Li, X.-W. Liu, C.-F. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 13592-13593.
- [73] J. Chen, P. Wang, J. Zhu, Q. Wan, S. J. Danishefsky, *Tetrahedron* **2010**, *66*, 2277-2283.
- [74] P. Siman, S. V. Karthikeyan, A. Brik, *Org. Lett.* **2012**, *14*, 1520-1523.
- [75] K. M. Cergol, R. E. Thompson, L. R. Malins, P. Turner, R. J. Payne, *Org. Lett.* **2014**, *16*, 290-293.
- [76] S. Shang, Z. Tan, S. Dong, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 10784-10786.
- [77] L. R. Malins, K. M. Cergol, R. J. Payne, *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 260-266.
- [78] K. S. Ajish Kumar, M. Haj-Yahya, D. Olschewski, H. A. Lashuel, A. Brik, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 8090-8094.
- [79] a) P. E. Dawson, *Isr. J. Chem.* **2011**, *51*, 862-867; b) L. R. Malins, R. J. Payne, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *22*, 70-78; c) L. R. Malins, R. J. Payne, *Aust. J. Chem.* **2015**, *68*, 521-537.
- [80] L. R. Malins, R. J. Payne, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *22*, 70-78.
- [81] R. E. Thompson, X. Liu, N. Alonso-García, P. J. B. Pereira, K. A. Jolliffe, R. J. Payne, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 8161-8164.
- [82] L. E. Canne, S. J. Bark, S. B. H. Kent, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 5891-5896.
- [83] J. Offer, P. E. Dawson, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 23-26.
- [84] P. Botti, M. R. Carrasco, S. B. H. Kent, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 1831-1833.
- [85] a) T. Kawakami, K. Akaji, S. Aimoto, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 1403-1405; b) D. W. Low, M. G. Hill, M. R. Carrasco, S. B. H. Kent, P. Botti, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 6554-6559.
- [86] Z. Harpaz, S. Loibl, O. Seitz, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26*, 1434-1437.
- [87] S. F. Loibl, Z. Harpaz, O. Seitz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 15055-15059.
- [88] a) J. Blake, C. H. Li, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, *78*, 4055-4058; b) J. P. Tam, Y. A. Lu, C. F. Liu, J. Shao, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 12485-12489.
- [89] R. Ingenito, E. Bianchi, D. Fattori, A. Pessi, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11369-11374.
- [90] G. W. Kenner, J. R. McDermott, R. C. Sheppard, *J. Chem. Soc. D* **1971**, 636.
- [91] a) B. J. Backes, A. A. Virgilio, J. A. Ellman, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 3055-3056; b) B. J. Backes, J. A. Ellman, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 2322-2330.
- [92] S. Futaki, K. Sogawa, J. Maruyama, T. Asahara, M. Niwa, H. Hojo, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 6237-6240.

-
- [93] a) K. Barlos, D. Gatos, J. Kallitsis, G. Papaphotiu, P. Sotiriu, Y. Wenqing, W. Schäfer, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 3943-3946; b) K. Barlos, D. Gatos, S. Kapolos, G. Papaphotiu, W. Schäfer, Y. Wenqing, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 3947-3950.
- [94] R. von Eggelkraut-Gottanka, A. Klose, A. G. Beck-Sickinger, M. Beyermann, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 3551-3554.
- [95] H. Hojo, Y. Onuma, Y. Akimoto, Y. Nakahara, Y. Nakahara, *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 25-28.
- [96] V. P. Terrier, H. Adihou, M. Arnould, A. F. Delmas, V. Aucagne, *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 339-345.
- [97] J. B. Blanco-Canosa, P. E. Dawson, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 6851-6855.
- [98] S. K. Mahto, C. J. Howard, J. C. Shimko, J. J. Ottesen, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 2488-2494.
- [99] J. B. Blanco-Canosa, B. Nardone, F. Albericio, P. E. Dawson, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 7197-7209.
- [100] a) J.-S. Zheng, S. Tang, Y. Guo, H.-N. Chang, L. Liu, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 542-546; b) G.-M. Fang, J.-X. Wang, L. Liu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 10347-10350.
- [101] G.-M. Fang, Y.-M. Li, F. Shen, Y.-C. Huang, J.-B. Li, Y. Lin, H.-K. Cui, L. Liu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 7645-7649.
- [102] W. Hou, X. Zhang, F. Li, C.-F. Liu, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 386-389.
- [103] a) N. Ollivier, J. Vicogne, A. Vallin, H. Drobecq, R. Desmet, O. El Mahdi, B. Leclercq, G. Goormachtigh, V. Fafeur, O. Melnyk, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 209-213; b) L. Raibaut, H. Adihou, R. Desmet, A. F. Delmas, V. Aucagne, O. Melnyk, *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 4061-4066; c) N. Ollivier, L. Raibaut, A. Blanpain, R. Desmet, J. Dheur, R. Mhidia, E. Boll, H. Drobecq, S. L. Pira, O. Melnyk, *J. Pept. Sci.* **2014**, *20*, 92-97.
- [104] a) D. P. Gamblin, S. I. van Kasteren, J. M. Chalker, B. G. Davis, *FEBS J.* **2008**, *275*, 1949-1959; b) C. T. Walsh, S. Garneau-Tsodikova, G. J. Gatto, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7342-7372.
- [105] P. A. Levene, C. L. Alsberg, *J. Biol. Chem.* **1906**, *2*, 127-133.
- [106] G. Burnett, E. P. Kennedy, *J. Biol. Chem.* **1954**, *211*, 969-980.
- [107] G. Manning, D. B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter, S. Sudarsanam, *Science* **2002**, *298*, 1912-1934.
- [108] T. A. Langan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1969**, *64*, 1276-1283.
- [109] W. Eckhart, M. A. Hutchinson, T. Hunter, *Cell* **1979**, *18*, 925-933.
- [110] P. Cohen, *Nat. Cell Biol.* **2002**, *4*, E127-E130.
- [111] a) M. Černý, J. Skalák, H. Cerna, B. Brzobohatý, *Journal of proteomics* **2013**, *92*, 2-27; b) S. A. Johnson, T. Hunter, *Nat. Biotech.* **2004**, *22*, 1093-1094.
- [112] P. Hornbeck, I. Chabra, J. Kornhauser, E. Skrzypek, B. Zhang, *Proteomics* **2004**, *4*, 1551-1561.
- [113] a) J. Cieřla, T. Frączyk, W. Rode, *Acta Biochim. Pol.* **2011**, *58*, 137-148; b) P. V. Attwood, *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1834*, 470-478.
- [114] C.-C. Chen, D. L. Smith, B. B. Bruegger, R. M. Halpern, R. A. Smith, *Biochemistry* **1974**, *13*, 3785-3789.

- [115] C. C. Chen, B. B. Bruegger, C. W. Kern, Y. C. Lin, R. M. Halpern, R. A. Smith, *Biochemistry* **1977**, *16*, 4852-4855.
- [116] E. Tan, P. G. Besant, X. L. Zu, C. W. Turck, M. A. Bogoyevitch, S. G. Lim, P. V. Attwood, G. C. Yeoh, *Carcinogenesis* **2004**, *25*, 2083-2088.
- [117] B. T. Wakim, G. D. Aswad, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 2722-2727.
- [118] H. de Bont, J. H. van Boom, R. M. J. Liskamp, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 2497-2500.
- [119] J. Bertran-Vicente, R. A. Serwa, M. Schümann, P. Schmieder, E. Krause, C. P. R. Hackenberger, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 13622-13628.
- [120] R. Behrendt, P. White, J. Offer, *J. Pept. Sci.* **2016**, *22*, 4-27.
- [121] E. A. Kitas, J. W. Perich, J. D. Wade, R. B. Johns, G. W. Tregear, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 6229-6232.
- [122] J. W. Perich, N. J. Ede, S. Eagle, A. M. Bray, *Lett. Pept. Sci.*, *6*, 91-97.
- [123] T. Wakamiya, K. Saruta, J.-i. Yasuoka, S. Kusumoto, *Chem. Lett.* **1994**, *23*, 1099-1102.
- [124] P. White, J. Beythien, *Innovations & perspectives in solid phase synthesis & combinatorial libraries*, Mayflower Scientific Ltd, Birmingham, **1996**.557
- [125] H. Paulsen, K. Adermann, *Liebigs Ann. Chem.* **1989**, *1989*, 751-769.
- [126] S. S. Chauhan, A. Varshney, B. Verma, M. W. Pennington, *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 4051-4054.
- [127] E. A. Ottinger, L. L. Shekels, D. A. Bernlohr, G. Barany, *Biochemistry* **1993**, *32*, 4354-4361.
- [128] H.-G. Chao, B. Leiting, P. D. Reiss, A. L. Burkhardt, C. E. Klimas, J. B. Bolen, G. R. Matsueda, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 7710-7711.
- [129] L. Otvos, Jr., I. Elekes, V. M. Lee, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1989**, *34*, 129-133.
- [130] P. W. R. Harris, G. M. Williams, P. Shepherd, M. A. Brimble, *Int. J. Pept. Res. Ther.* **2008**, *14*, 387-392.
- [131] H. Eberhard, O. Seitz, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 1349-1355.
- [132] O. Ludemann-Homburger, *Specialty Chemicals Magazine* **2013**, 30-33.
- [133] a) S. Funakoshi, H. Fukuda, N. Fujii, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 6981-6985; b) European Patent, S. Funakoshi, H. Kukuda, EP 0552368A1, **1991**; c) US Patent, S. Funakoshi, H. Kukuda, 5,648,462, **1997**
- [134] a) V. Aucagne, I. E. Valverde, P. Marceau, M. Galibert, N. Dendane, A. F. Delmas, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 11320-11324; b) V. Aucagne, I. Valverde, P. Marceau, M. Galibert, N. Dendane, A. Delmas, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 11320-11324.
- [135] F. Mende, O. Seitz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 4577-4580.
- [136] F. Mende, M. Beisswenger, O. Seitz, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 11110-11118.
- [137] M. F. Templin, D. Stoll, M. Schrenk, P. C. Traub, C. F. Vöhringer, T. O. Joos, *Trends Biotechnol.* **2002**, *20*, 160-166.
- [138] H. Zhu, M. Bilgin, R. Bangham, D. Hall, A. Casamayor, P. Bertone, N. Lan, R. Jansen, S. Bidlingmaier, T. Houfek, *et al.*, *Science* **2001**, *293*, 2101-2105.

-
- [139] P. Jonkheijm, D. Weinrich, H. Schröder, C. M. Niemeyer, H. Waldmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 9618-9647.
- [140] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, *171*, 737-738.
- [141] C. W. Dieffenbach, T. M. Lowe, G. S. Dveksler, *Genome Res.* **1993**, *3*, S30-S37.
- [142] A. Klug, *Annu. Rev. Biochem.* **2010**, *79*, 213-231.
- [143] H. I. Chen, M. Sudol, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 7819-7823.
- [144] B. J. Mayer, M. Hamaguchi, H. Hanafusa, *Nature* **1988**, *332*, 272-275.
- [145] a) P. F. Predki, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 8-13; b) C. M. Niemeyer, *Trends Biotechnol.* **2002**, *20*, 395-401.
- [146] K. Bussow, E. Nordhoff, C. Lubbert, H. Lehrach, G. Walter, *Genomics* **2000**, *65*, 1-8.
- [147] a) W. Kusnezow, J. D. Hoheisel, *J. Mol. Recognit.* **2003**, *16*, 165-176; b) W. Kusnezow, A. Jacob, A. Walijew, F. Diehl, J. D. Hoheisel, *Proteomics* **2003**, *3*, 254-264.
- [148] J. Sagiv, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 92-98.
- [149] J. C. Love, L. A. Estroff, J. K. Kriebel, R. G. Nuzzo, G. M. Whitesides, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1103-1169.
- [150] a) L. A. Lyon, M. D. Musick, M. J. Natan, *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 5177-5183; b) S. Zeng, D. Baillargeat, H.-P. Ho, K.-T. Yong, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 3426-3452.
- [151] B. Johnsson, S. Löfås, G. Lindquist, *Anal. Biochem.* **1991**, *198*, 268-277.
- [152] a) J. Groll, E. V. Amirgoulova, T. Ameringer, C. D. Heyes, C. Röcker, G. U. Nienhaus, M. Möller, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 4234-4239; b) S. F. D'Souza, S. S. Godbole, *J. Biochem. Biophys. Methods* **2002**, *52*, 59-62.
- [153] C. Mateo, R. Torres, G. Fernández-Lorente, C. Ortiz, M. Fuentes, A. Hidalgo, F. López-Gallego, O. Abian, J. M. Palomo, J. M. Guisan, *et al.*, *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 772-777.
- [154] a) R. K. Crossland, W. E. Wells, V. J. Shiner, *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 4217-4219; b) P. Kumar, K. C. Gupta, *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 507-512.
- [155] a) R. Fernandez-Lafuente, C. M. Rosell, V. Rodriguez, C. Santana, G. Soler, A. Bastida, J. M. Guisán, *Enzyme Microb. Technol.* **1993**, *15*, 546-550; b) M. B. Biskup, J. U. Müller, R. Weingart, R. R. Schmidt, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1007-1015.
- [156] A. Collioud, J. F. Clemence, M. Saenger, H. Sigrist, *Bioconjugate Chem.* **1993**, *4*, 528-536.
- [157] S. Pathak, A. K. Singh, J. R. McElhanon, P. M. Dentinger, *Langmuir* **2004**, *20*, 6075-6079.
- [158] Y. Kumada, D. Kuroki, H. Yasui, T. Ohse, M. Kishimoto, *J. Biosci. Bioeng.* **2010**, *109*, 583-587.
- [159] a) H. Ge, *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, e3; b) D. Wang, S. Liu, B. J. Trummer, C. Deng, A. Wang, *Nat. Biotech.* **2002**, *20*, 275-281.
- [160] a) A. H. Talasaz, M. Nemat-Gorgani, Y. Liu, P. Ståhl, R. W. Dutton, M. Ronaghi, R. W. Davis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 14773-14778; b) P.-C. Lin, S.-H. Ueng, M.-C. Tseng, J.-L. Ko, K.-T. Huang, S.-C. Yu, A. Adak, Y.-J. Chen, C.-C. Lin, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 4392-4396.

- [161] a) F. Rusmini, Z. Zhong, J. Feijen, *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 1775-1789; b) P. C. Lin, S. H. Ueng, M. C. Tseng, J. L. Ko, K. T. Huang, S. C. Yu, A. K. Adak, Y. J. Chen, C. C. Lin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4286-4290.
- [162] N. Budisa, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6426-6463.
- [163] L. Wang, P. G. Schultz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 34-66.
- [164] a) J. M. Bobbitt, *Adv. Carbohydr. Chem.* **1956**, *11*, 1-41; b) J. A. Rothfus, E. L. Smith, *J. Biol. Chem.* **1963**, *238*, 1402-1410.
- [165] K. F. Geoghegan, J. G. Stroh, *Bioconjugate Chem.* **1992**, *3*, 138-146.
- [166] P. Wu, W. Shui, B. L. Carlson, N. Hu, D. Rabuka, J. Lee, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 3000-3005.
- [167] a) M. Nishikawa, T. Yamamoto, N. Kojima, K. Kikuo, T. Fujii, Y. Sakai, *Biotechnol. Bioeng.* **2008**, *99*, 1472-1481; b) K. Nakanishi, H. Muguruma, I. Karube, *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 1695-1700.
- [168] a) R. C. Bailey, G. A. Kwong, C. G. Radu, O. N. Witte, J. R. Heath, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 1959-1967; b) A. Dirksen, P. Dawson, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 2543-2548; c) A. Dirksen, S. Dirksen, T. M. Hackeng, P. E. Dawson, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 15602-15603; d) J. R. Falsey, M. Renil, S. Park, S. Li, K. S. Lam, *Bioconjugate Chem.* **2001**, *12*, 346-353.
- [169] E. L. Schmid, T. A. Keller, Z. Dienes, H. Vogel, *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 1979-1985.
- [170] M. Sanguinetti, L. Novarese, B. Posteraro, S. Ranno, E. De Carolis, G. Pecorini, B. Lucignano, F. Ardito, G. Fadda, *J. Clin. Microbiol.* **2005**, *43*, 6189-6193.
- [171] a) F. Toepert, T. Knaute, S. Guffler, J. R. Pirés, T. Matzdorf, H. Oschkinat, J. Schneider-Mergener, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 1136-1140; b) J. A. Camarero, Y. Kwon, M. A. Coleman, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 14730-14731.
- [172] a) N. Winssinger, S. Ficarro, P. G. Schultz, J. L. Harris, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 11139-11144; b) N. Svensen, Juan J. Díaz-Mochón, M. Bradley, *Chem. Biol.* **2011**, *18*, 1284-1289.
- [173] Y.-C. Huang, G.-M. Fang, L. Liu, *Natl. Sci. Rev.* **2015**.
- [174] Y.-M. Li, M.-Y. Yang, Y.-C. Huang, Y.-T. Li, P. R. Chen, L. Liu, *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 1015-1022.
- [175] J. S. Rush, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 12240-12241.
- [176] a) C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057-3064; b) V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596-2599.
- [177] M. Steinhagen, K. Holland-Nell, M. Meldal, A. G. Beck-Sickinger, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 2426-2430.
- [178] a) G. H. McGall, A. D. Barone, M. Diggelmann, S. P. A. Fodor, E. Gentalen, N. Ngo, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 5081-5090; b) G. Wallraff, J. Labadie, P. Brock, R. DiPietro, T. Nguyen, T. Huynh, W. Hinsberg, G. McGall, *Journal Name: CHEMTECH; Journal Volume: 27; Journal Issue: 2; Other Information: PBD: Feb 1997* **1997**, Medium: X; Size: pp. 22-32; c) P. B. Garland, P. J. Serafinowski, *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, e99-e99.

-
- [179] R. Frank, *Tetrahedron* **1992**, *48*, 9217-9232.
- [180] A. Dikmans, U. Beutling, E. Schmeisser, S. Thiele, R. Frank, *QSAR Comb. Sci.* **2006**, *25*, 1069-1080.
- [181] C. Landgraf, S. Panni, L. Montecchi-Palazzi, L. Castagnoli, J. Schneider-Mergener, R. Volkmer-Engert, G. Cesareni, *PLoS Biol.* **2004**, *2*, 94 - 103.
- [182] R. Volkmer, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 1431-1442.
- [183] F. Breitling, Peptidarrays und Antikörperbibliotheken, <https://www.imt.kit.edu/1007.php>, 18.05.2016.
- [184] S. Fodor, J. Read, M. Pirrung, L. Stryer, A. Lu, D. Solas, *Science* **1991**, *251*, 767-773.
- [185] a) V. Stadler, T. Felgenhauer, M. Beyer, S. Fernandez, K. Leibe, S. Güttler, M. Gröning, K. König, G. Torralba, M. Hausmann, *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 7132-7135; b) M. Beyer, A. Nesterov, I. Block, K. König, T. Felgenhauer, S. Fernandez, K. Leibe, G. Torralba, M. Hausmann, U. Trunk, *et al.*, *Science* **2007**, *318*, 1888-1888.
- [186] E. K. Greuber, P. Smith-Pearson, J. Wang, A. M. Pendergast, *Nat. Rev. Cancer* **2013**, *13*, 559-571.
- [187] J. Bennet., *Edinb. Med. Surg. J.* **1845**, *64*, 413-423.
- [188] D. Graigie., *Edinb. Med. Surg. J.* **1845**, *64*, 400-413.
- [189] R. Virchow., *Froriep's Neue Notizen aus dem Gebiet der Natur.- und Heilkunde* **1845**, *36*, 151-155.
- [190] S. Wong, O. N. Witte, *Annu. Rev. Immunol.* **2004**, *22*, 247-306.
- [191] P. Nowell., D. Hungerford, *Science* **1960**, *132*, 1488-1501.
- [192] S. Bose, M. Deininger, J. Gora-Tybor, J. M. Goldman, J. V. Melo, *Blood* **1998**, *92*, 3362-3367.
- [193] A. M. Pendergast, M. L. Gishizky, M. H. Havlik, O. N. Witte, *Mol. Cell. Biol.* **1993**, *13*, 1728-1736.
- [194] I. Moarefi, M. LaFevre-Bernt, F. Sicheri, M. Huse, C.-H. Lee, J. Kuriyan, W. T. Miller, *Nature* **1997**, *385*, 650-653.
- [195] S. C. Harrison, *Cell* **2003**, *112*, 737-740.
- [196] D. Barila, G. Superti-Furga, *Nat. Genet.* **1998**, *18*, 280-282.
- [197] Z. Tatárová, J. Brábek, D. Rösel, M. Novotný, *PLoS One* **2012**, *7*, e36310.
- [198] S. Chen, L. P. O'Reilly, T. E. Smithgall, J. R. Engen, *J. Mol. Biol.* **2008**, *383*, 414-423.
- [199] M. Warmuth, M. Bergmann, A. Prieß, K. Häuslmann, B. Emmerich, M. Hallek, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 33260-33270.
- [200] M. A. Meyn, M. B. Wilson, F. A. Abdi, N. Fahey, A. P. Schiavone, J. Wu, J. M. Hochrein, J. R. Engen, T. E. Smithgall, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 30907-30916.
- [201] M. L. Stahl, C. R. Ferenz, K. L. Kelleher, R. W. Kriz, J. L. Knopf, *Nature* **1988**, *332*, 269-272.
- [202] B. J. Mayer, *J. Cell Sci.* **2001**, *114*, 1253-1263.
- [203] T. Pawson, G. D. Gish, *Cell* **1992**, *71*, 359-362.

- [204] K. Saksela, P. Permi, *FEBS Lett.* **2012**, *586*, 2609-2614.
- [205] G. Mirey, A. Soulard, C. Orange, S. Friant, B. Winsor, *Biochem. Soc. Trans.* **2005**, *33*, 1247-1249.
- [206] H. Dewar, D. T. Warren, F. C. Gardiner, C. G. Gourlay, N. Satish, M. R. Richardson, P. D. Andrews, K. R. Ayscough, *Mol. Biol. Cell* **2002**, *13*, 3646-3661.
- [207] F. Mende, *Doktorarbeit*, Humboldt-Universität zu Berlin (Berlin), **2010**.
- [208] a) L.-O. Andersson., A. Rehnström., D. L. Eaker., *Eur. J. Biochem.* **1971**, *20*, 371-380; b) N. Barbero, E. Barni, C. Barolo, P. Quagliotto, G. Viscardi, L. Napione, S. Pavan, F. Bussolino, *Dyes Pigm.* **2009**, *80*, 307-313.
- [209] L. Nieba, S. E. Nieba-Axmann, A. Persson, M. Hämäläinen, F. Edebratt, A. Hansson, J. Lidholm, K. Magnusson, A. F. Karlsson, A. Plückthun, *Anal. Biochem.* **1997**, *252*, 217-228.
- [210] ThermoFisherScientific, Produktdatenblatt, <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/15240>, 07.06.2016.
- [211] M. Maltese, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 7615-7625.
- [212] M. Krumrey, *Bachelor Arbeit*, Humboldt-Universität zu Berlin (Berlin), **2013**.
- [213] Z. Wu, F. A. Fernandez-Lima, D. H. Russell, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2010**, *21*, 522-533.
- [214] J. V. Staros, H. Bayley, D. N. Standring, J. R. Knowles, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1978**, *80*, 568-572.
- [215] H. Staudinger, J. Meyer, *Helv. Chim. Acta* **1919**, *2*, 635-646.
- [216] A.-M. Faucher, C. Grand-Maître, *Synth. Commun.* **2003**, *33*, 3503-3511.
- [217] a) C. P. R. Hackenberger, D. Schwarzer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 10030-10074; b) E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6974-6998; c) Y. Gong, L. Pan, *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56*, 2123-2132.
- [218] R. G. Kallen, *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 6236-6248.
- [219] J. M. Guisán, *Enzyme Microb. Technol.* **1988**, *10*, 375-382.
- [220] H. Faltz, J. Bohrisch, W. Wohlauf, M. Pätzelt, P. G. Jones, J. Liebscher, *Tetrahedron* **1996**, *52*, 9035-9046.
- [221] G. T. Hermanson, in *Bioconjugate Techniques (Third edition)*, Academic Press, Boston, **2013**, pp. 787-838.
- [222] Y. Akiyama, H. Otsuka, Y. Nagasaki, M. Kato, K. Kataoka, *Bioconjugate Chem.* **2000**, *11*, 947-950.
- [223] I. M. Olazabal, L. M. Machesky, *J. Cell. Biol.* **2001**, *154*, 679-682.
- [224] N. Adey, A. Mataragnon, J. Rider, J. Carter, B. Kay, *Gene* **1995**, *156*, 27-31.
- [225] E. C. B. Johnson, S. B. H. Kent, *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 1795-1799.
- [226] Y. Shin, K. A. Winans, B. J. Backes, S. B. H. Kent, J. A. Ellman, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11684-11689.
- [227] F. G. Bordwell, D. J. Algrim, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 2964-2968.
- [228] F. G. Bordwell, D. Algrim, *J. Org. Chem.* **1976**, *41*, 2507-2508.

-
- [229] H. Mayr, A. R. Ofial, *J. Phys. Org. Chem.* **2008**, *21*, 584-595.
- [230] M. Breugst, T. Tokuyasu, H. Mayr, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 5250-5258.
- [231] S. Minegishi, H. Mayr, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 286-295.
- [232] L. Dario, M. Agelamaria, in *Encyclopedia of Supramolecular Chemistry, Band 2* (Eds.: L. Atwood, J. W. Steed), CRC Press, Columbia, Missouri, USA, **2004**.
- [233] L. A. Carpino, D. Ionescu, A. El-Faham, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 2460-2465.
- [234] R. Behrendt, P. White, J. Offer, *J. Pept. Sci.* **2016**, *22*, 4-27.
- [235] F. Garcia-Martin, P. White, R. Steinauer, S. Cote, J. Tulla-Puche, F. Albericio, *Biopolymers* **2006**, *84*, 566-575.
- [236] a) J. Wang, *Curr. Opin. Genet. Dev.* **1993**, *3*, 35-43; b) W. Franz, P. Berger, J. Wang, *The EMBO journal* **1989**, *8*, 137-147; c) P. Jackson, D. Baltimore, *The EMBO journal* **1989**, *8*, 449-456; d) E. K. Greuber, P. Smith-Pearson, J. Wang, A. M. Pendergast, *Nat. Rev. Cancer* **2013**, *13*, 559-571.
- [237] D. Srinivasan, D. M. Kaetzel, R. Plattner, *Cell. Signal.* **2009**, *21*, 1143-1150.
- [238] A. R. Viguera, J. L. R. Arrondo, A. Musacchio, M. Saraste, L. Serrano, *Biochemistry* **1994**, *33*, 10925-10933.
- [239] M. Pisabarro, L. Serrano, M. Wilmanns, *J. Mol. Biol.* **1998**, *281*, 513-521.
- [240] S. Panjarian, R. E. Iacob, S. Chen, J. R. Engen, T. E. Smithgall, *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 5443-5450.
- [241] L. N. Johnson, R. J. Lewis, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 2209-2242.
- [242] T. Schindler, F. Sicheri, A. Pico, A. Gazit, A. Levitzki, J. Kuriyan, *Mol. Cell* **1999**, *3*, 639-648.
- [243] B. Nagar, O. Hantschel, M. Seeliger, J. M. Davies, W. I. Weis, G. Superti-Furga, J. Kuriyan, *Mol. Cell* **2006**, *21*, 787-798.
- [244] A. Musacchio, M. Saraste, M. Wilmanns, *Nature: Struct. Biol.* **1994**, *1*, 546-551.
- [245] B. Cowper, T. M. Sze, B. Premdjee, A. F. Bongat White, A. Hacking, D. Macmillan, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 3208-3210.
- [246] Z. Nikolovska-Coleska, R. Wang, X. Fang, H. Pan, Y. Tomita, P. Li, P. P. Roller, K. Krajewski, N. G. Saito, J. A. Stuckey, *et al.*, *Anal. Biochem.* **2004**, *332*, 261-273.
- [247] J. R. Lakowicz., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer US: Boston, MA, Boston, MA, **2006**
- [248] M. Ormö, A. B. Cubitt, K. Kallio, L. A. Gross, R. Y. Tsien, S. J. Remington, *Science* **1996**, *273*, 1392-1395.
- [249] R. Page, W. Peti, I. A. Wilson, R. C. Stevens, K. Wüthrich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 1901-1905.
- [250] O. Zhang, J. D. Forman-Kay, *Biochemistry* **1995**, *34*, 6784-6794.
- [251] S. Tenreiro, K. Eckermann, T. F. Outeiro, *Frontiers in Molecular Neuroscience* **2014**, *7*.

- [252] a) E. Klein, F. Vánky, H. Ben-Bassat, H. Neumann, P. Ralph, J. Zeuthen, A. Polliack, *Int. J. Cancer* **1976**, *18*, 421-431; b) L. C. Andersson, K. Nilsson, C. G. Gahmberg, *Int. J. Cancer* **1979**, *23*, 143-147.
- [253] J. Cox, M. Mann, *Nat. Biotech.* **2008**, *26*, 1367-1372.
- [254] B. Kuropka, A. Witte, J. Sticht, N. Waldt, P. Majkut, C. P. R. Hackenberger, B. Schraven, E. Krause, S. Kliche, C. Freund, *Mol. Cell. Proteomics* **2015**, *14*, 2961-2972.
- [255] L. W. Donaldson, G. Gish, T. Pawson, L. E. Kay, J. D. Forman-Kay, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 14053-14058.
- [256] Z. Xu, T. Hou, N. Li, Y. Xu, W. Wang, *Mol. Cell. Proteomics* **2012**, *11*.
- [257] C. J. A. Sigrist, E. de Castro, L. Cerutti, B. A. Cuche, N. Hulo, A. Bridge, L. Bougueleret, I. Xenarios, *Nucleic Acids Res.* **2012**.
- [258] G. E. Crooks, G. Hon, J.-M. Chandonia, S. E. Brenner, *Genome Res.* **2004**, *14*, 1188-1190.
- [259] M. J. Eck, S. E. Shoelson, S. C. Harrison, *Nature* **1993**, *362*, 87-91.
- [260] K. Saksela, P. Permi, *FEBS Lett.* **2012**, *586*, 2609-2614.
- [261] Y.-L. Yang, S.-R. Lin, J.-S. Chen, S.-W. Lin, S.-L. Yu, H.-Y. Chen, C.-T. Yen, C.-Y. Lin, J.-F. Lin, K.-H. Lin, *et al.*, *Leukemia Research*, *34*, 18-23.
- [262] S. A. Jensen, A. E. Calvert, G. Volpert, F. M. Kouri, L. A. Hurley, J. P. Luciano, Y. Wu, A. Chalastanis, A. H. Futerman, A. H. Stegh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 5682-5687.
- [263] M. Uhlen, P. Oksvold, L. Fagerberg, E. Lundberg, K. Jonasson, M. Forsberg, M. Zwahlen, C. Kampf, K. Wester, S. Hober, *et al.*, *Nat. Biotech.* **2010**, *28*, 1248-1250.
- [264] R. Li, Ann M. Pendergast, *Curr. Biol.* **2011**, *21*, 1534-1542.
- [265] M. E. Feigin, S. K. Muthuswamy, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2009**, *21*, 694-700.
- [266] Y. Merbl, M. W. Kirschner, *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine* **2011**, *3*, 347-356.
- [267] a) G. Duan, D. Walther, *PLoS Comput. Biol.* **2015**, *11*, e1004049; b) B. T. Seet, I. Dikic, M.-M. Zhou, T. Pawson, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2006**, *7*, 473-483.
- [268] R. B. Jones, A. Gordus, J. A. Krall, G. MacBeath, *Nature* **2006**, *439*, 168-174.
- [269] R. Zitterbart, O. Seitz, 2016012912064300DE, **2016**
- [270] S. F. Loibl, R. Zitterbart, Z. Harpaz, O. Seitz, *Chem. Sci.* **2016**.
- [271] G. R. Fulmer, A. J. M. Miller, N. H. Sherden, H. E. Gottlieb, A. Nudelman, B. M. Stoltz, J. E. Bercaw, K. I. Goldberg, *Organometallics* **2010**, *29*, 2176-2179.
- [272] a) V. Krchňák, J. Vágnera, P. Šafářb, M. Leblb, *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1988**, *53*, 2542; b) V. Krchňák, J. Vágner, M. Lebl, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1988**, *32*, 415-416.
- [273] W. S. Hancock, J. E. Battersby, *Anal. Biochem.* **1976**, *71*, 260-264.
- [274] a) S. C. Gill, P. H. von Hippel, *Anal. Biochem.* **1989**, *182*, 319-326; b) C. N. Pace, F. Vajdos, L. Fee, G. Grimsley, T. Gray, *Protein Sci.* **1995**, *4*, 2411-2423.
- [275] M. Carducci, L. Licata, D. Peluso, L. Castagnoli, G. Cesareni, *Amino Acids* **2010**, *38*, 1541-1547.

[276] M. M. Bradford, *Anal. Biochem.* **1976**, 72, 248-254.

9. Verbindungsverzeichnis wichtiger Verbindungen

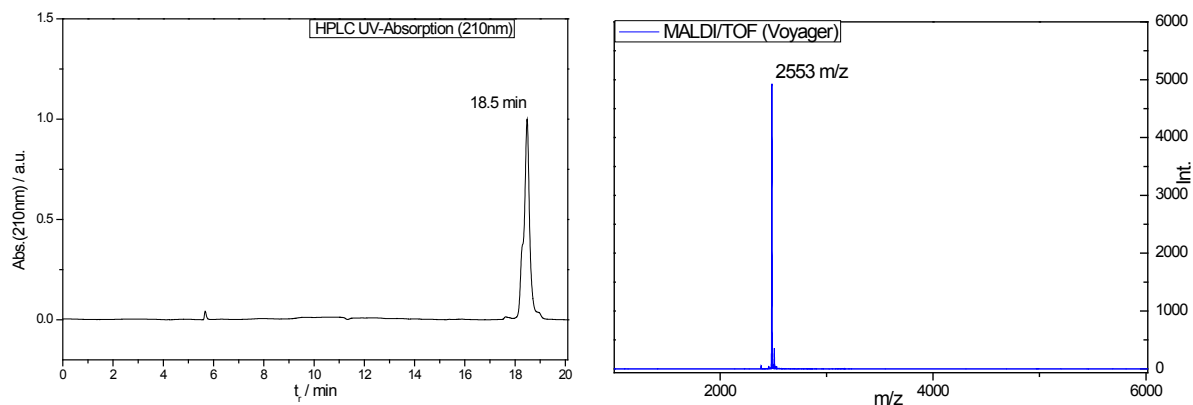
Verbindung	Nr.:	Seite
Fmoc-Tyr[PO(NMe ₂) ₂]-OH Baustein	42	22
modifizierter Sulfonlinker für die selbstreinigende Peptidthioestersynthese	47	25
Zyklisierungslinker	48	25
H-K _(Biotin) -SATPTAVALYNFAGEQPGDL-SBzl (YSC84)	54	43
H-K _(Biotin) LYRAG-SBzl	88	46
Azidothiol-Linker für die Mikrotiterplatten Funktionalisierung	99	53
Aldehyd-modifizierte Agarosekugeln	126	61
Mercapto-polyethylenglycol-acetal Linkers	141	65
Aldehyd-funktionalisierten Mikrotiterplatten	143	65
3BP1 Adapterproteinsequenz FAM-βAlaβAlaAPTMPPLPP-NH ₂	203	87
3BP2 Adapterproteinsequenz FAM-βAlaβAlaPPAYPPPPVP-NH ₂	204	87
Artifizieller Abl-SH3 Binder p41 FAM-βAlaβAlaAPSYSPPPP-NH ₂	205	87
Interdomänenpeptid (ID) FAM-βAlaβAlaPAPKRNKPTVYGVSPNY-NH ₂	206	87
3BP1' unmarkiert H-APTMPPLPP-NH ₂	219	99
ID' unmarkiert H-PAPKRNKPTVYGVSPNY-NH ₂	220	99
Y ⁷ Y ³⁰ Y ⁵² Abl-SH3-Domäne immobilisiert auf 143	181	84
pY ⁷ Abl-SH3-Domäne immobilisiert auf 143	182	84
pY ³⁰ Abl-SH3-Domäne immobilisiert auf 143	183	84
pY ⁵² Abl-SH3-Domäne immobilisiert auf 143	184	84
pY ³⁰ pY ⁵² Abl-SH3-Domäne immobilisiert auf 143	185	84
pY ⁷ pY ³⁰ Abl-SH3-Domäne immobilisiert auf 143	186	84
pY ⁷ pY ⁵² Abl-SH3-Domäne immobilisiert auf 143	187	84
pY ⁷ pY ³⁰ pY ⁵² Abl-SH3-Domäne immobilisiert auf 143	188	84
Y ⁷ Y ³⁰ Y ⁵² Abl-SH3-Domäne in Lösung	210	95
pY ⁷ Abl-SH3-Domäne in Lösung	214	96
pY ⁵² Abl-SH3-Domäne in Lösung	215	96
pY ³⁰ pY ⁵² Abl-SH3-Domäne in Lösung	216	96
pY ⁷ pY ⁵² Abl-SH3-Domäne in Lösung	217	96
pY ⁷ pY ³⁰ pY ⁵² Abl-SH3-Domäne in Lösung	218	96

10. Anhang

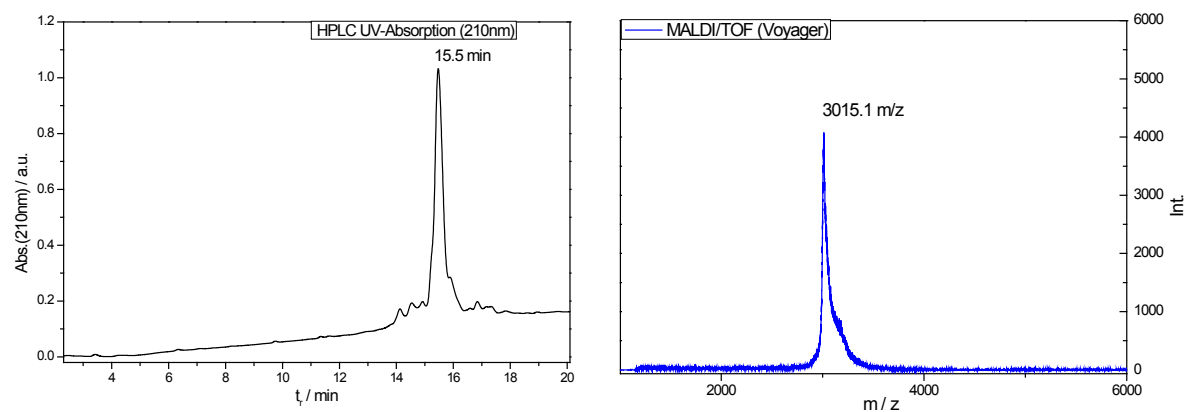
10.1 Chromatogramme und Massenspektren von verwendeten Peptiden

Die Peptide sind entsprechend der Reinform der Erstnennung im Text aufgeführt.

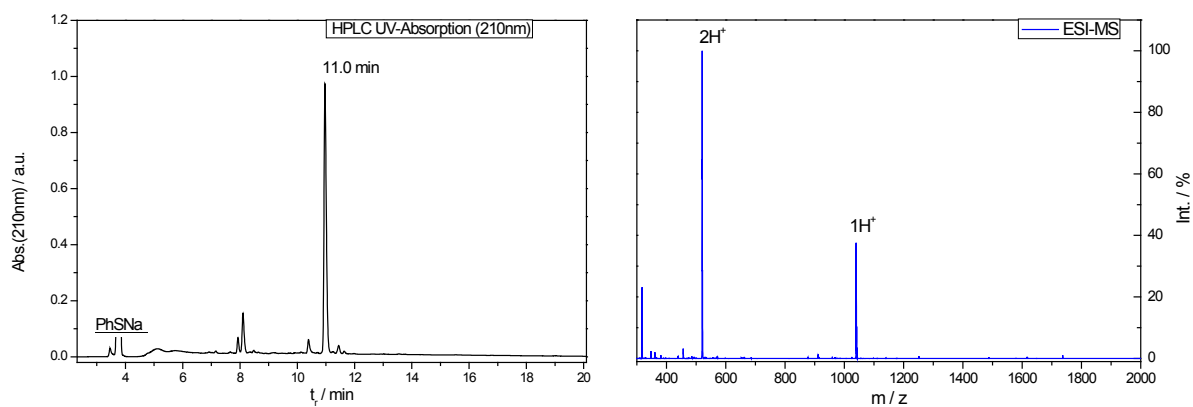
H-K^(Bt)SATPTAVALYNFAGEQPGDL-SBzl (54)

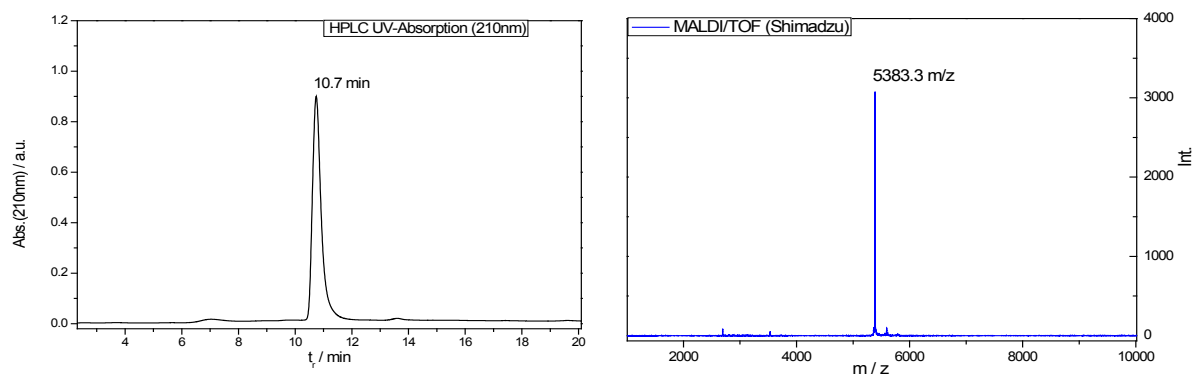
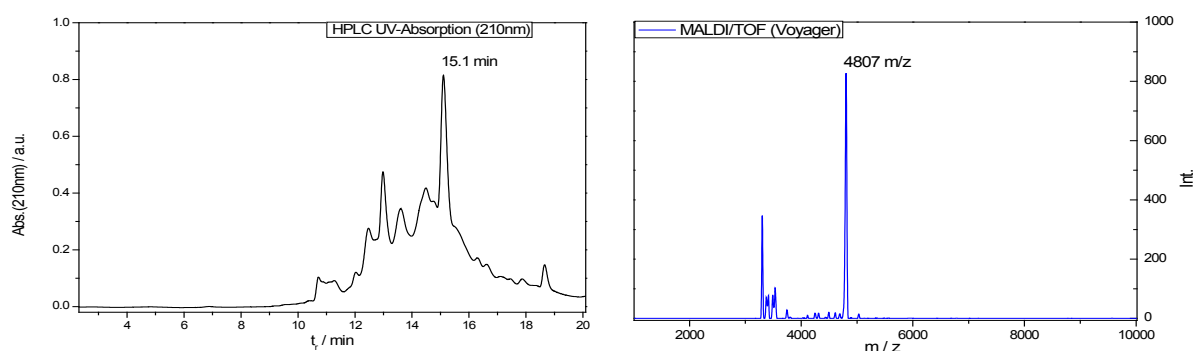
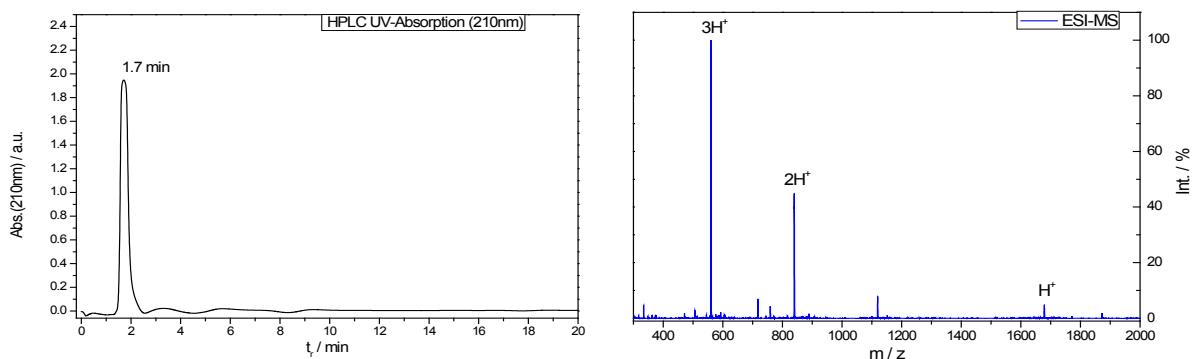
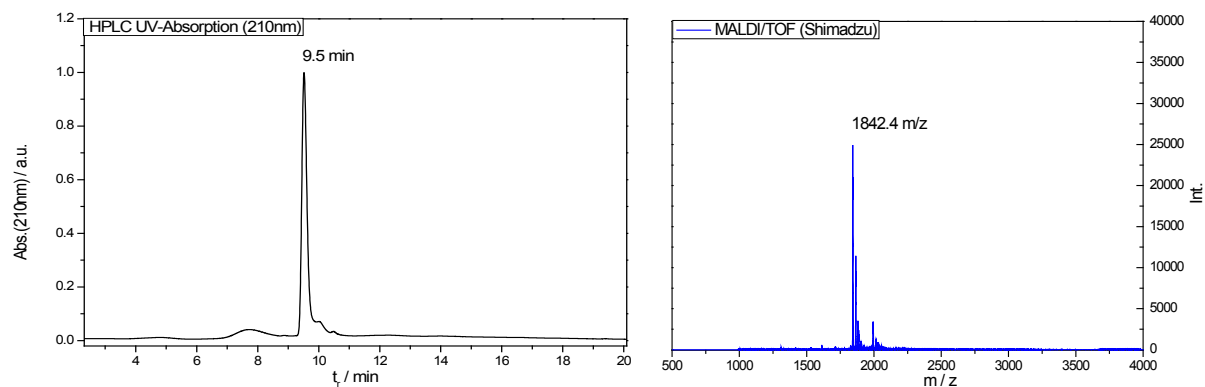


H-K^(Bt)SATPTAVALYNFAGEQPGDLAFKKG-SBzl (59)

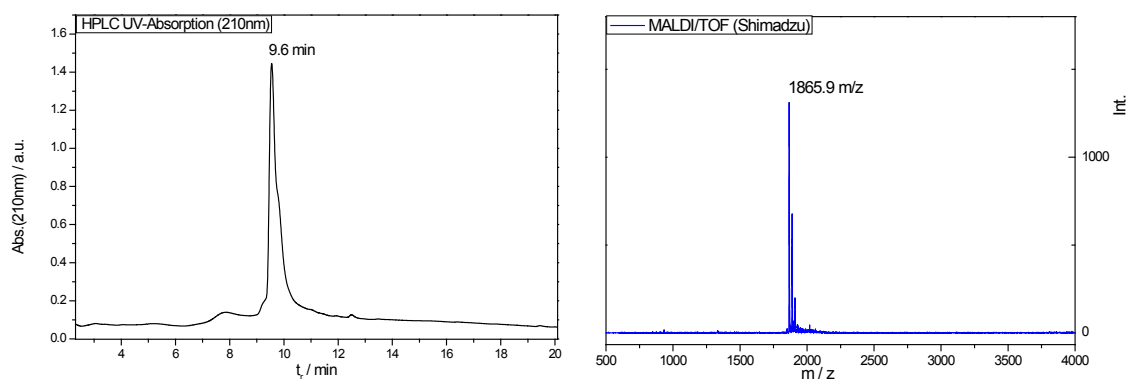


H-K^(Bt)LYRAG-SBzl (88)

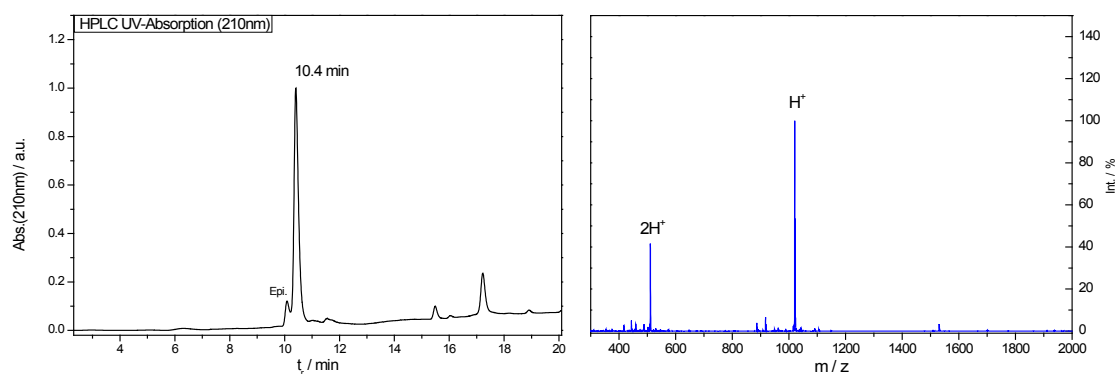


H-CFKKGDVITILKKSDSQNDWWTGRTNGKEGIFPANYVRVS-H₆-NH₂ (71)**H-CVITILKKSDSQNDWWTGRTNGKEGIFPANYVRVS-H₆-NH₂ (73)****H-CRAEYSK-H₆-NH₂ (89)****K^(Bt)LYRAGARAEYSKC-NH₂ (102)**

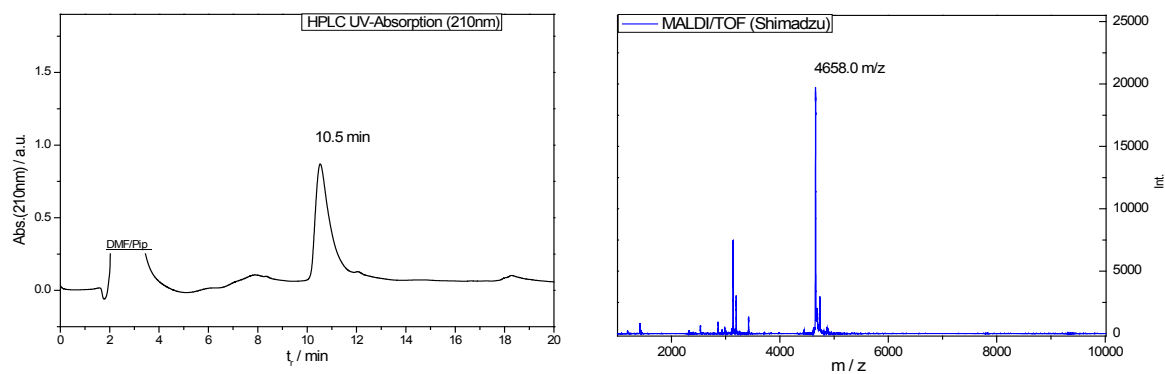
$K^{(Bt)}$ LYRAGCRAEYSK-Pra-NH₂ (101)



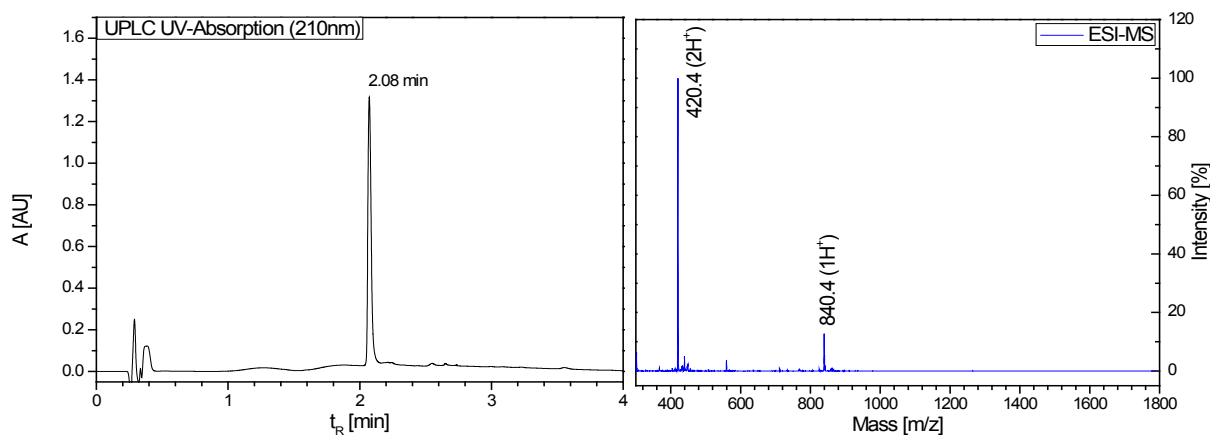
H-CEAAAEAYV-Pra-NH₂ (106)

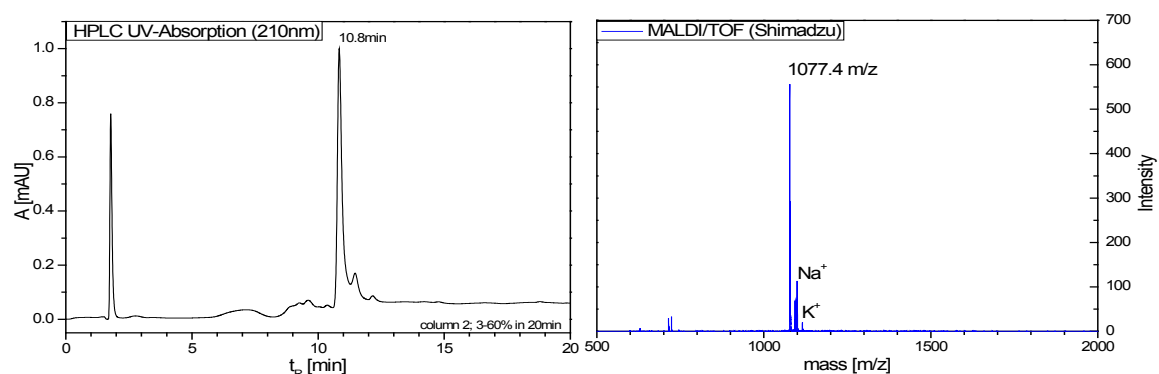
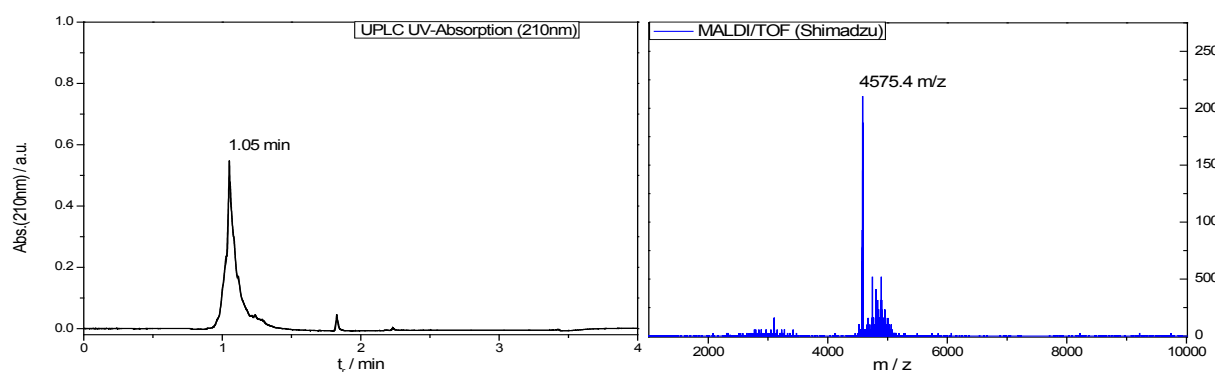
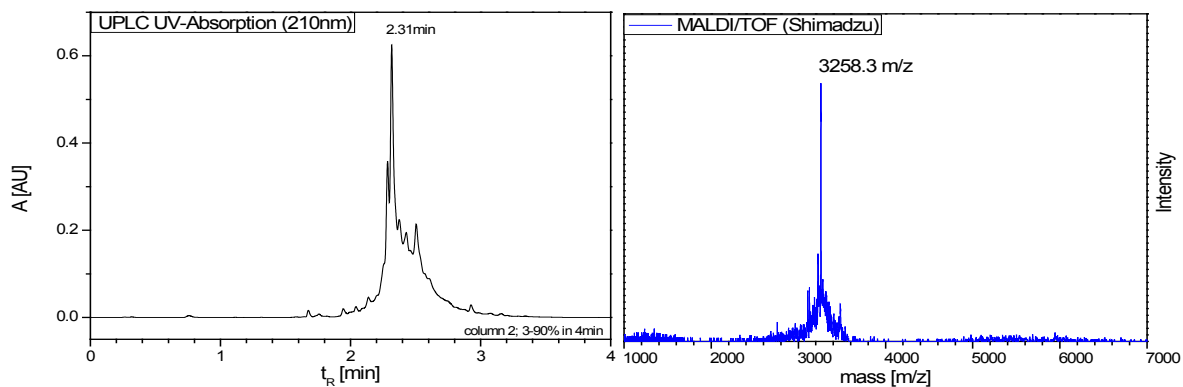
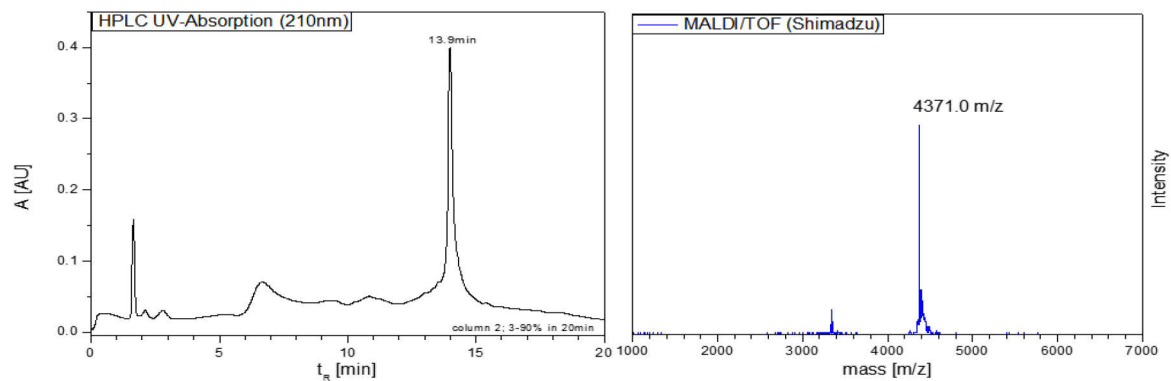


H-CFKKGDVITILKKSDSQNDWWTGRTNGKEGIFPANYVRVS-Pra-NH₂ (109)

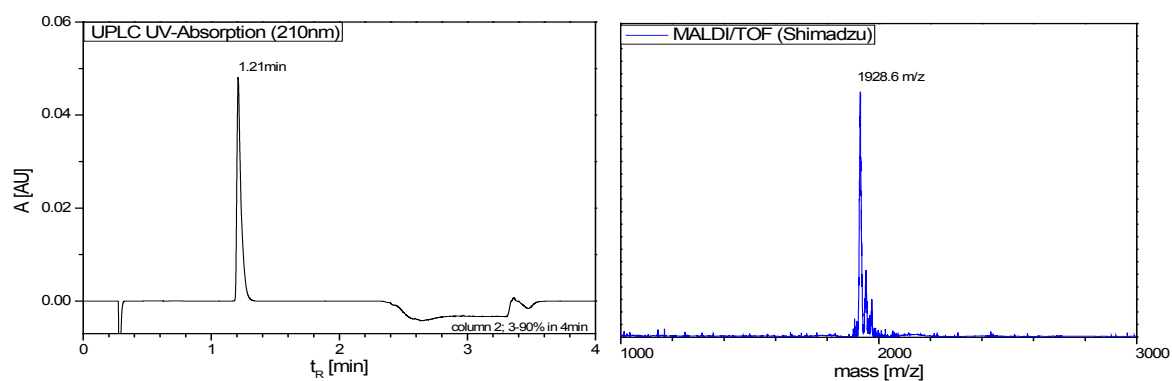


H-CGLYGAEGGG-N₂H₃ (116)

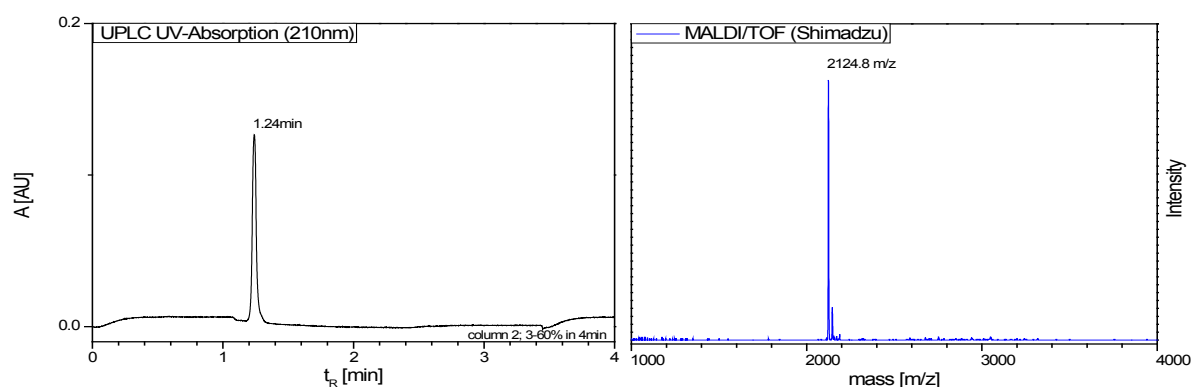


K^(Bt)GLYGEGGG-N₂H₃ (153)**H-CFKKGDVITILKKSDSQNDWWTGRTNGKEGIFPANYVRVS-N₂H₃ (144)****H-Pen-DDDWWLGELEKDGSKGLFPSNYVSLGNBAIa-N₂H₃ (147)****H-K^(Bt) KKENPWATAEYDYDAAEDNELTFVENDKIINIEF-SBzI (146)**

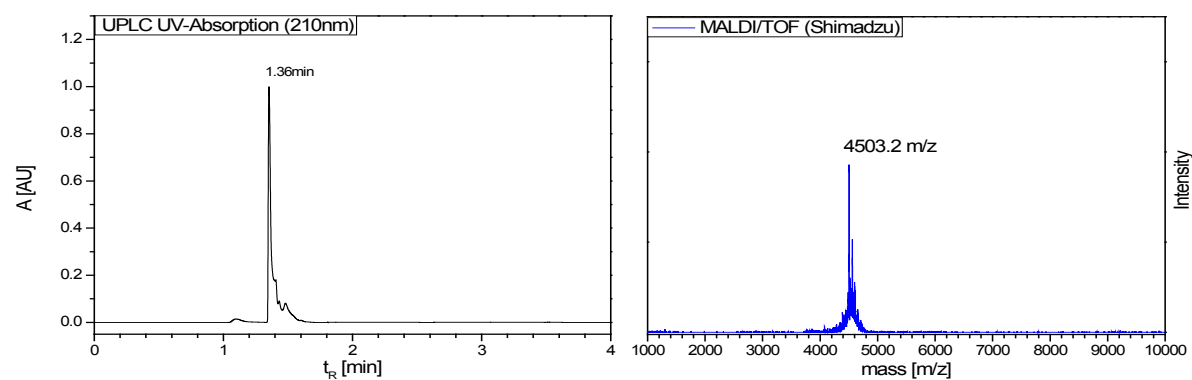
FAM- β Ala β Ala-GTTNRGPPPLPPRA-NH₂ (155)



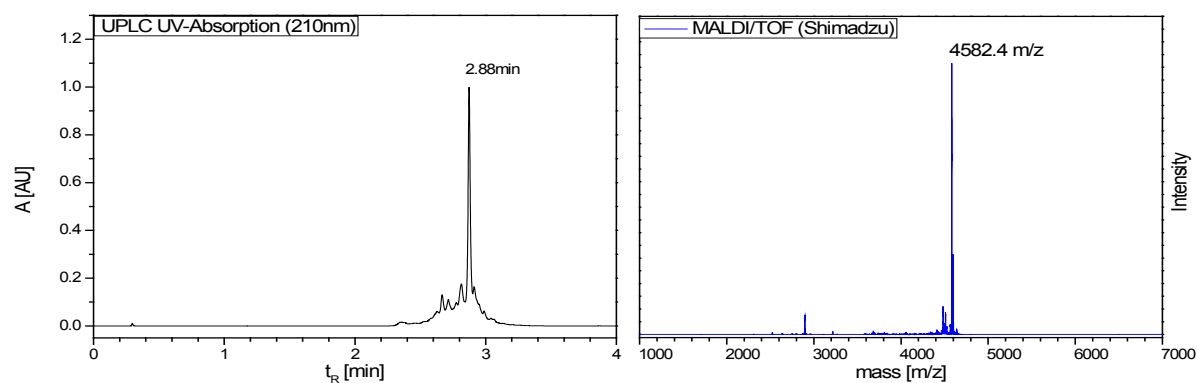
FAM- β Ala β Ala-RPKRRAPPPVPPKP-NH₂ (156)

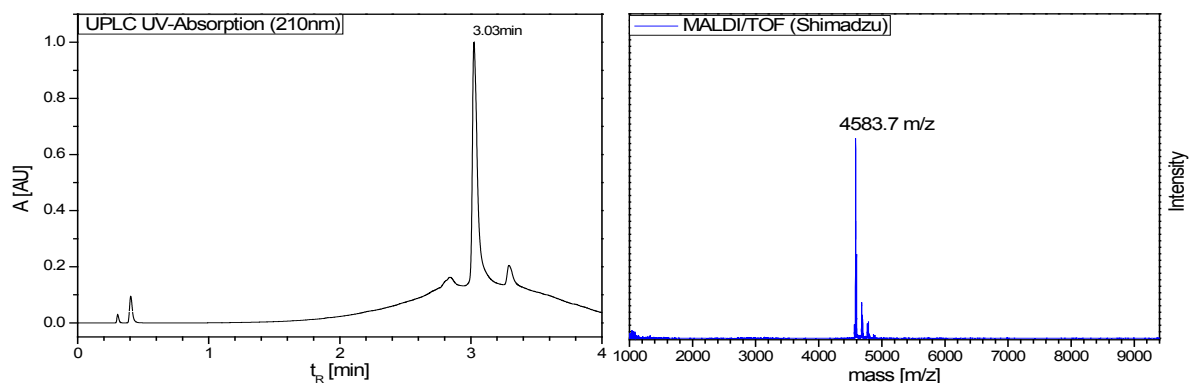
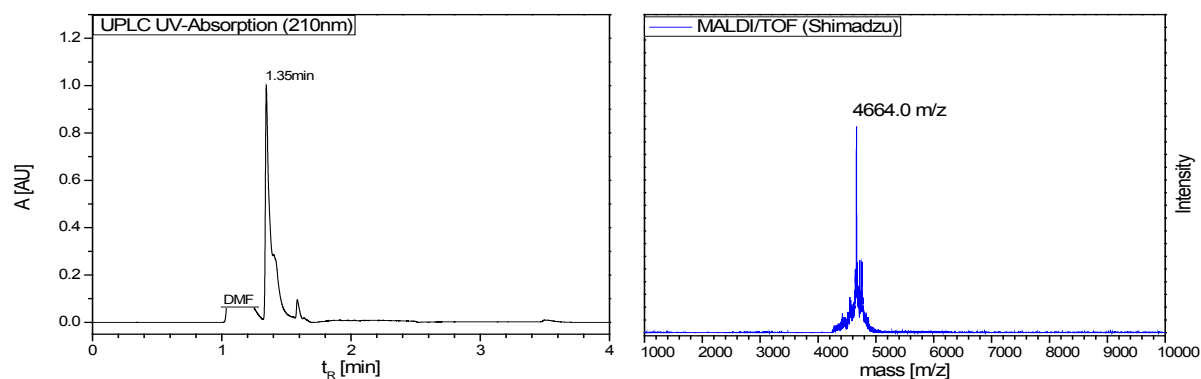
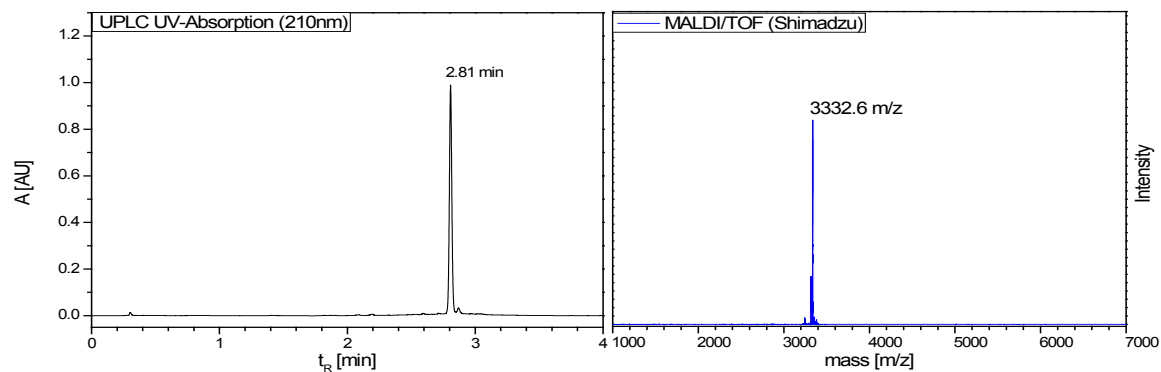
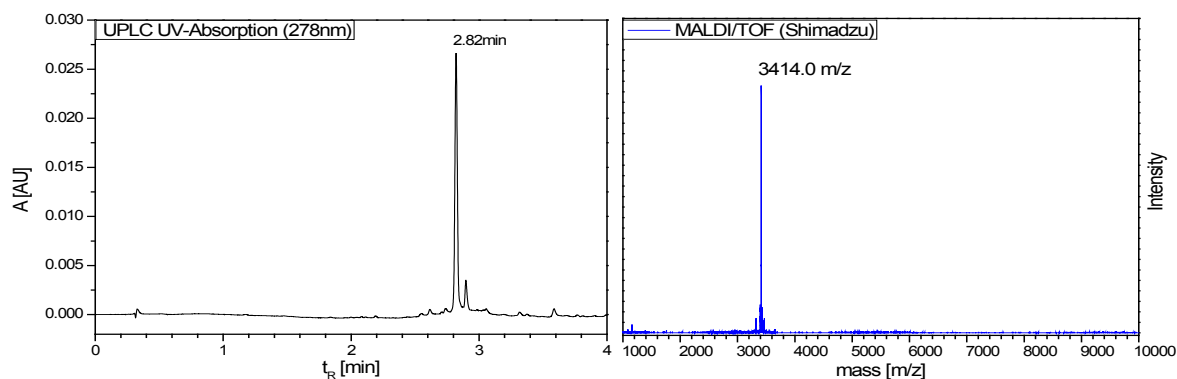


K^(Bt)NLFVALYDFVASGDNTLSITKGEKLRVLGYNHNGEW-SBzl (177)

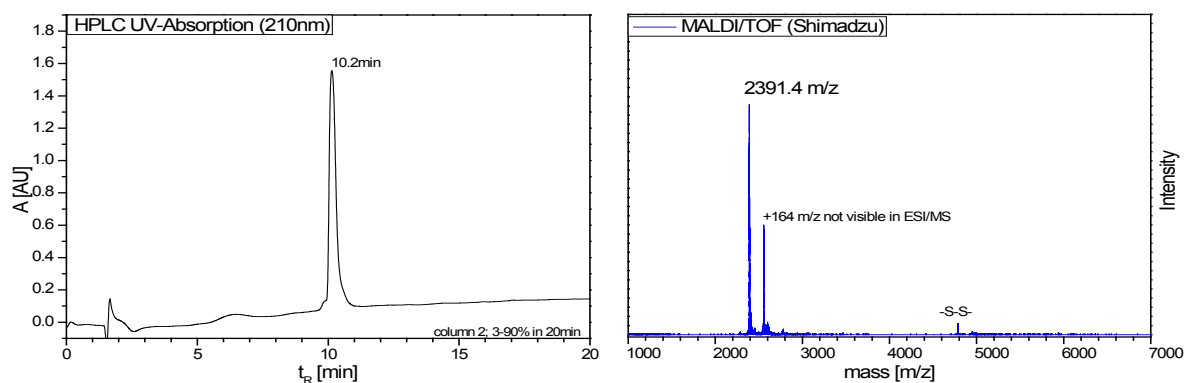


H-K^(Bt)NLFVAL^{pY}DFVASGDNTLSITKGEKLRVLGYNHNGEW-SBzl (178)

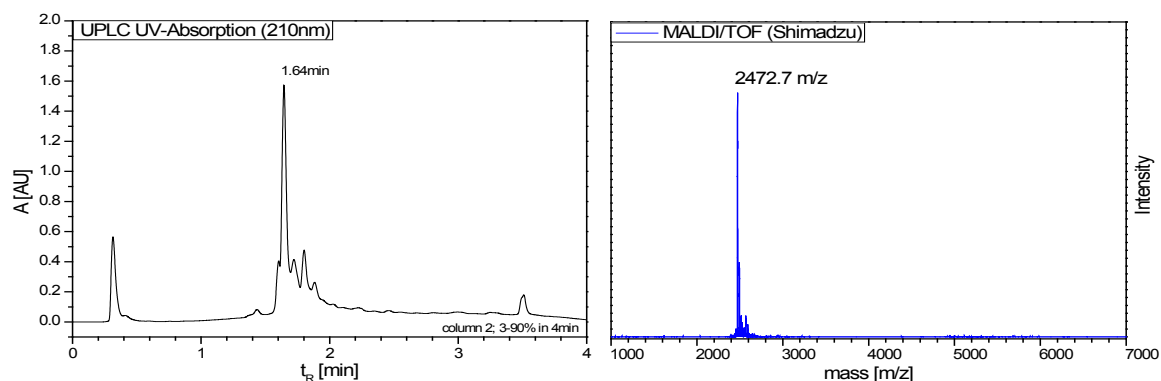


H-K^(Bt)NLFVALYDFVASGDNTLSITKGEKLRVLGpYNHNGEW-SBzl (179)**H-K^(Bt)NLFVALpYDFVASGDNTLSITKGEKLRVLGpYNHNGEW-SBzl (180)****K^(Bt)NLFVALYDFVASGDNTLSITKGEKLR-SBzl (193)****K(Bt)NLFVALpYDFVASGDNTLSITKGEKLR-SBzl (194)**

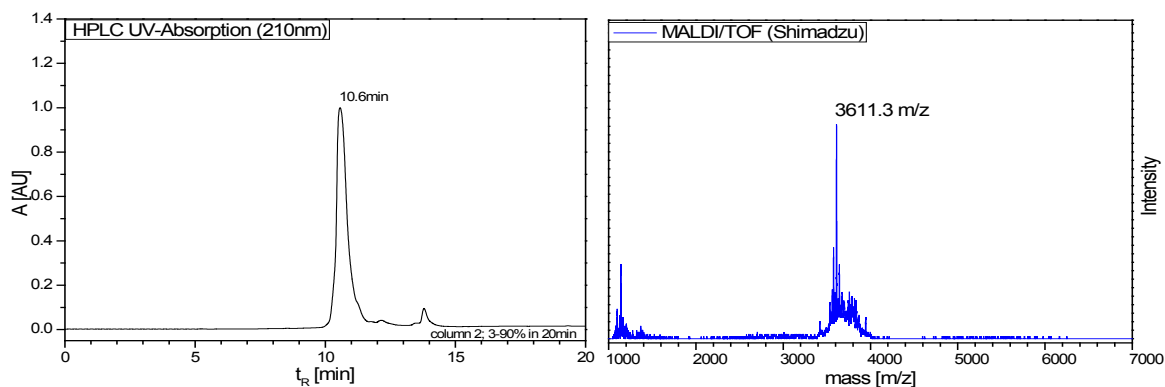
H-CEAQTKNQGQGWVPSNYITPVNBAIa-N₂H₃ (175)



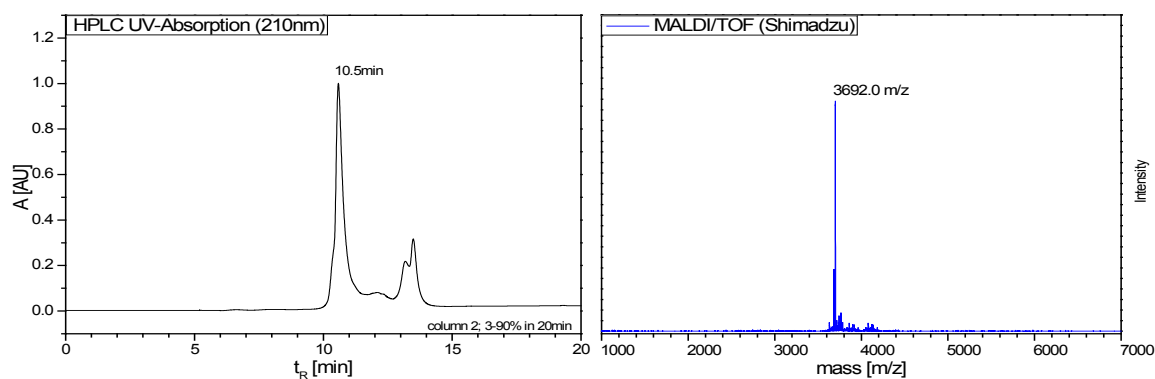
H-CEAQTKNQGQGWVPSN^pYITPVNBAIa-N₂H₃ (176)

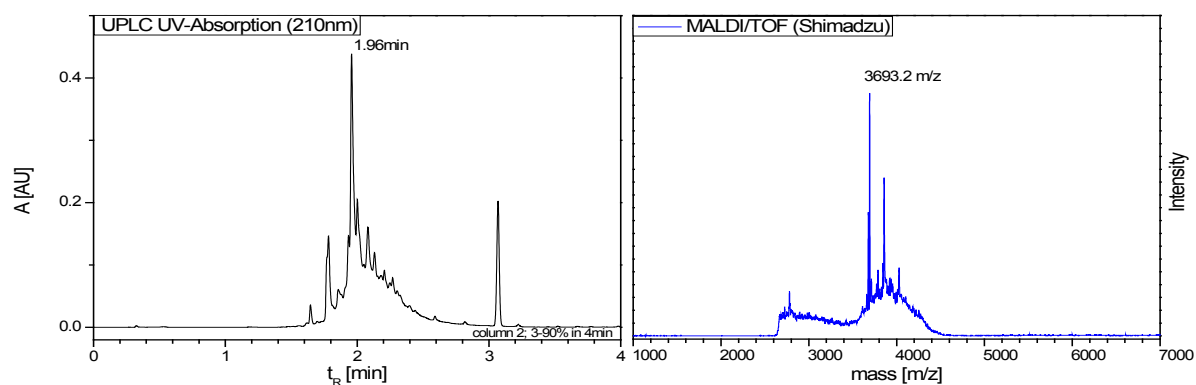
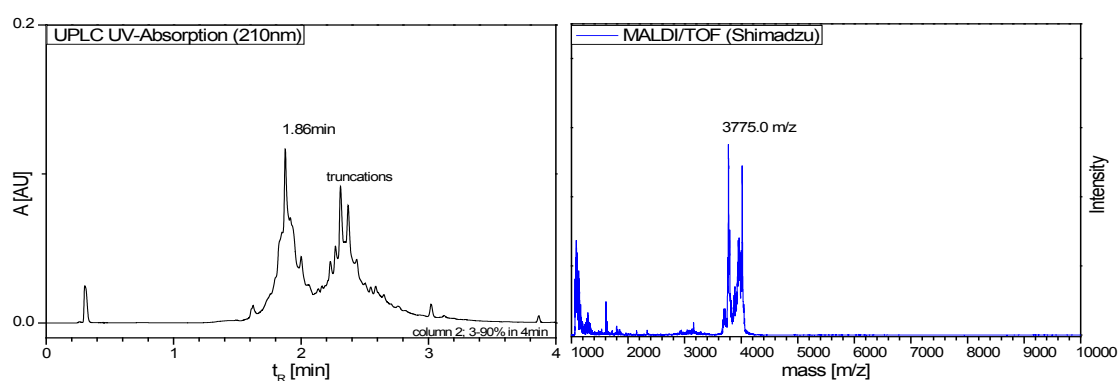
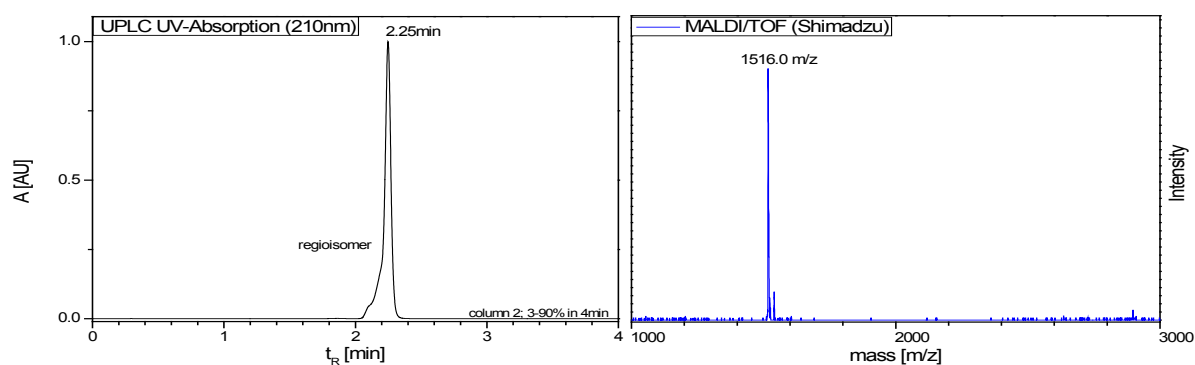
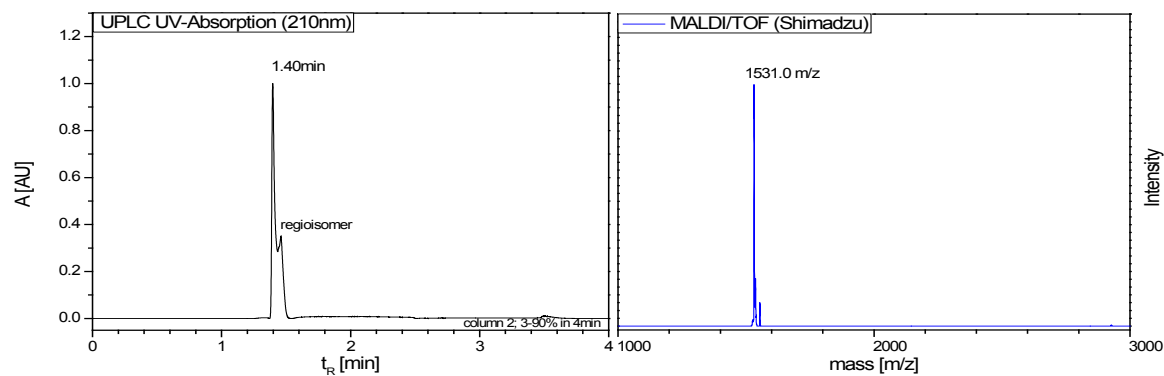


H-Pen-LGYNQNGEWSEVRSKNGQGWVPSNYITPVNBAIa-N₂H₃ (189)

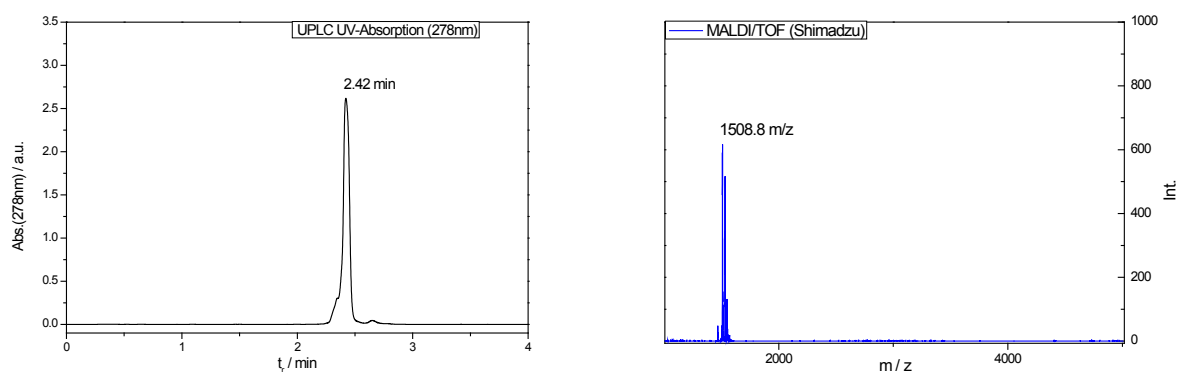


H-Pen-LG^pYNQNGEWSEVRSKNGQGWVPSNYITPVNBAIa-N₂H₃ (190)

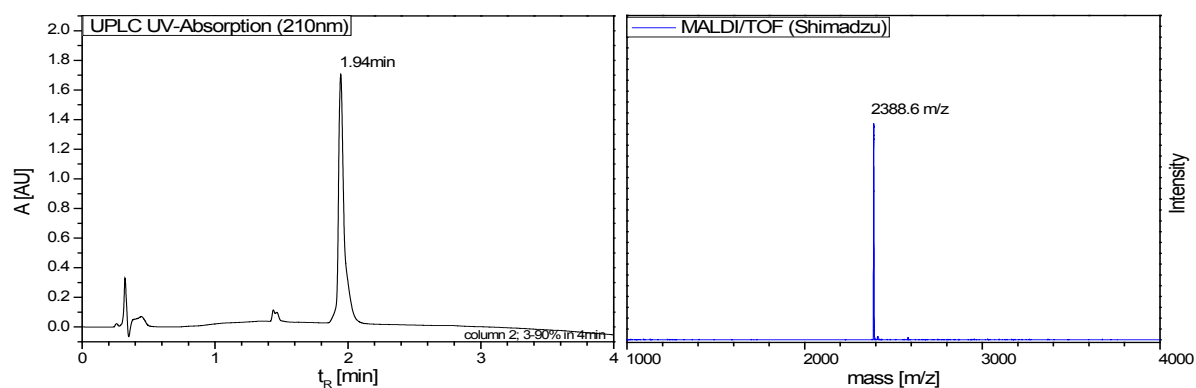


H-Pen-LGYNQNGEWSEVRSKNGQGWPVSNpYITPVNBAla-N₂H₃ (191)**H-Pen-LGpYNQNGEWSEVRSKNGQGWPVSNpYITPVNBAla-N₂H₃ (192)****3BP2-Peptid: FAM-BAIaBAIa-APTMPPLPP-NH₂ (203)****3BP2-Peptid: FAM-BAIaBAIa-PPAYPPPPVP-NH₂ (204)**

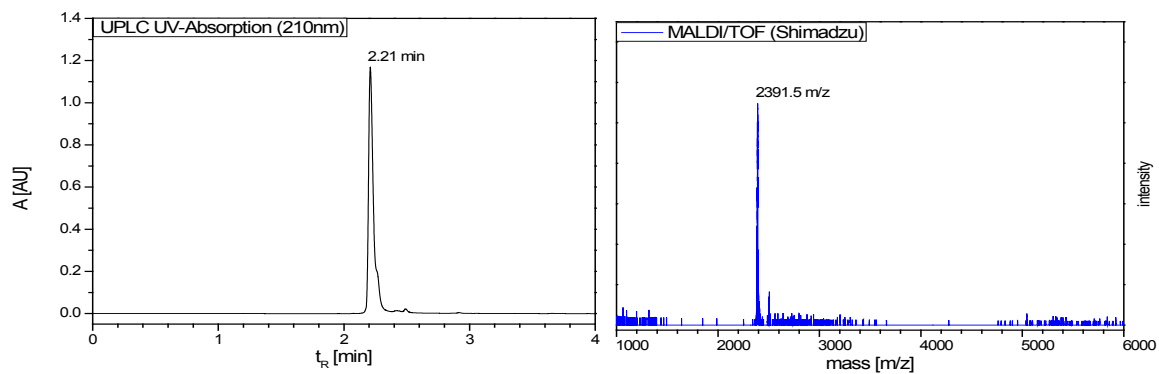
p41-Peptid: FAM-βAlaβAla-APSYSPPPP-NH₂ (205)



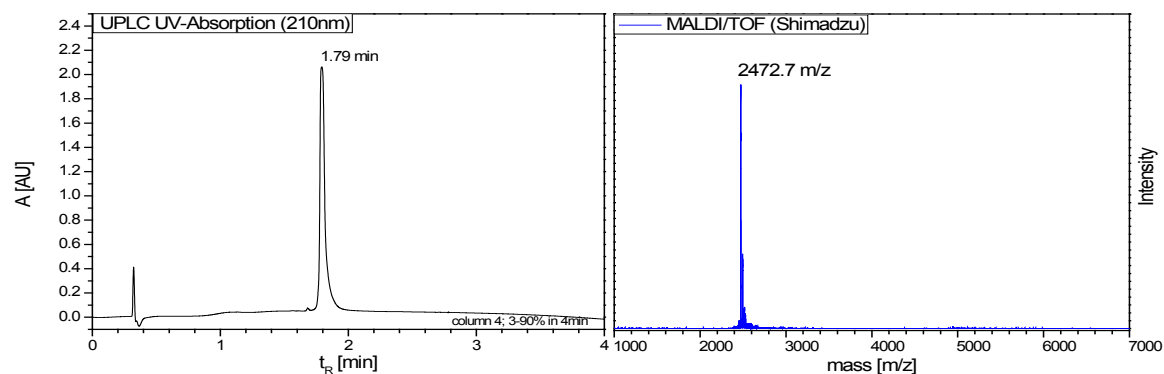
ID-Peptid: FAM-βAlaβAla-PAPKRNKPTVYGVSPNY-NH₂ (206)

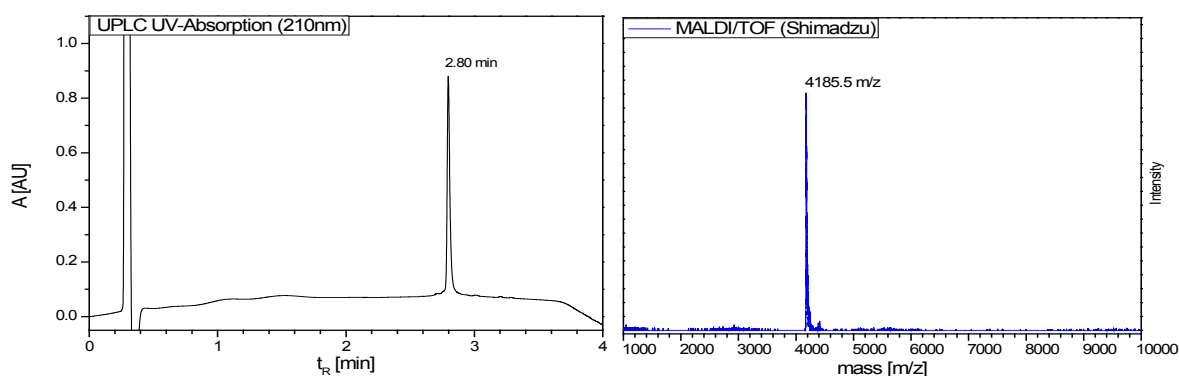
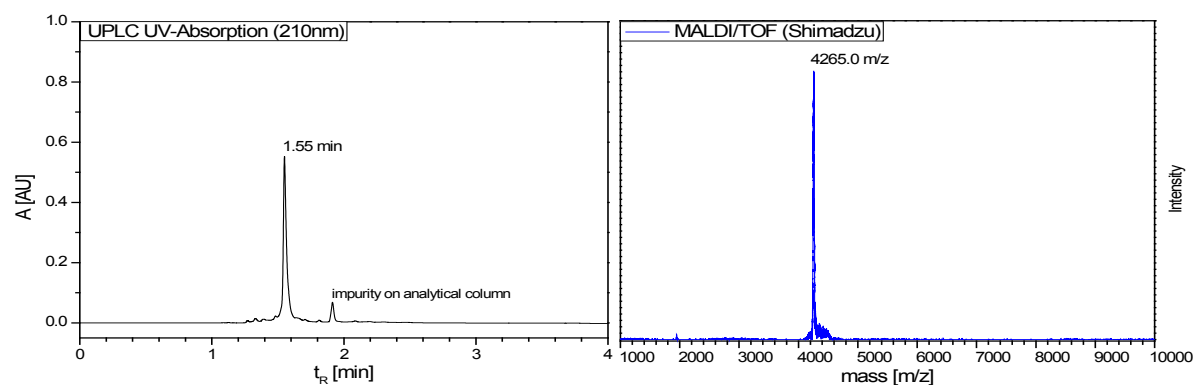
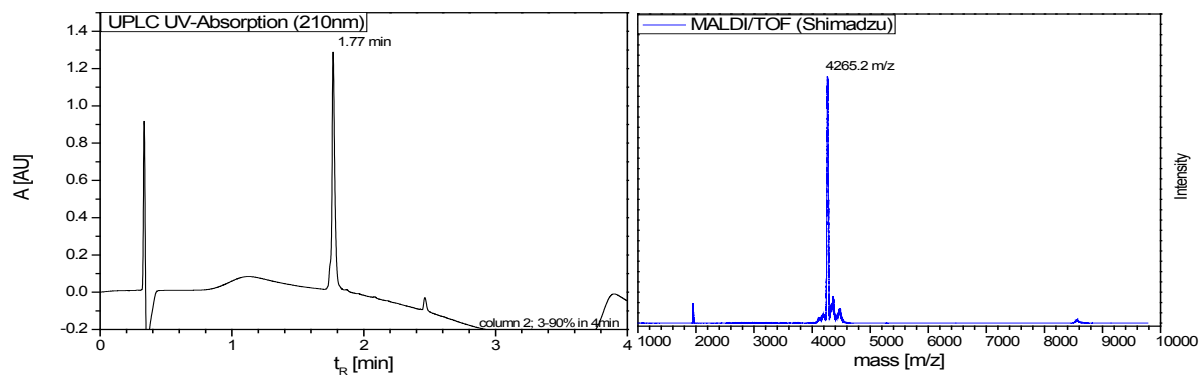


H-CEAQTKNGQGWPVSNYITPVNβAla-N₂H₃ (175) –gereinigt

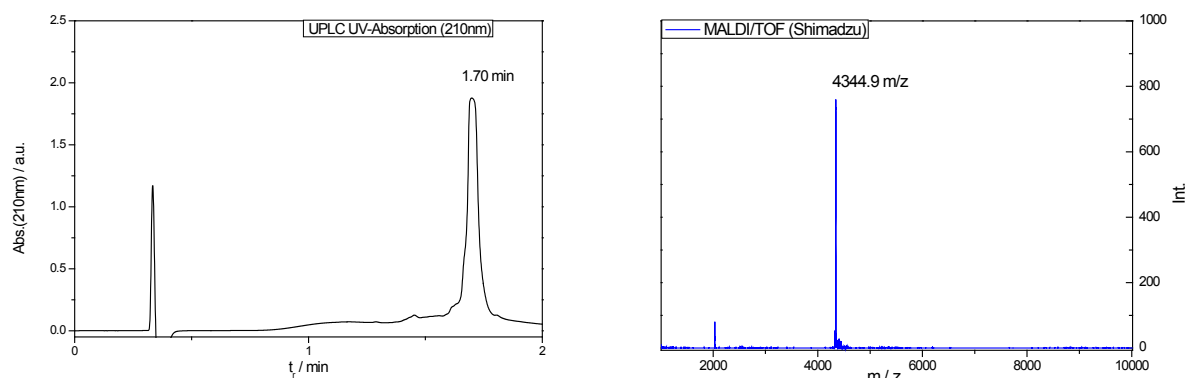


H-CEAQTKNGQGWPVSN**YITPVNβAla-N₂H₃ (176) –gereinigt**

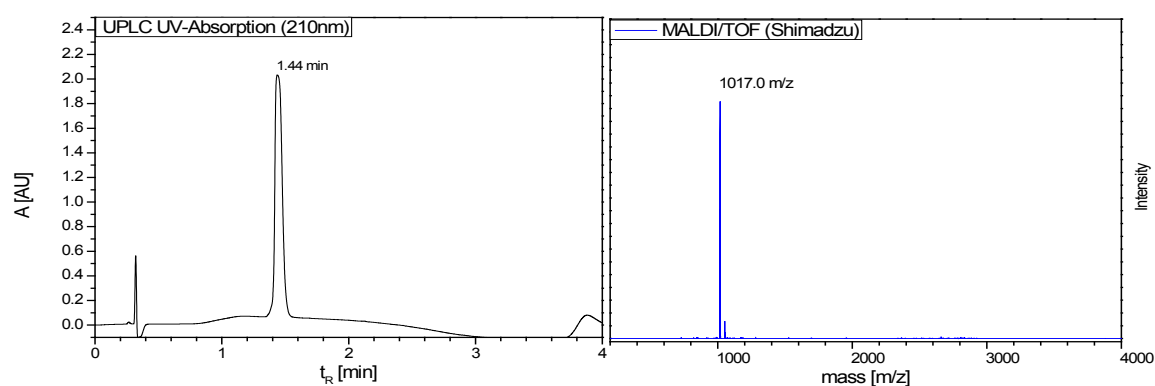


H-KNLFVALYDFVASGDNTLSITKGEKLRVLGYNHNGEW-N₂H₃ (207)gereinigt**H-KNLFVAL^{pY}DFVASGDNTLSITKGEKLRVLGYNHNGEW-N₂H₃(211)gereinigt****H-KNLFVALYDFVASGDNTLSITKGEKLRVLG^{pY}NHNGEW-N₂H₃(212)gereinigt**

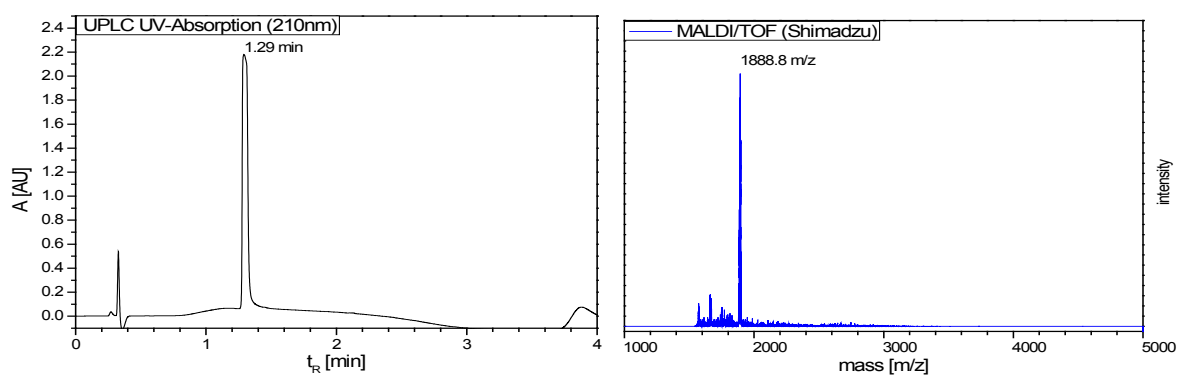
H-KNLFVAL_pYDFVASGDNTLSITKGEKLRVLG_pYNHNGEW-N₂H₃(213)gereinigt

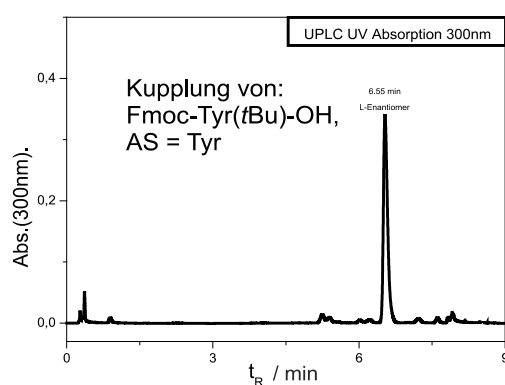
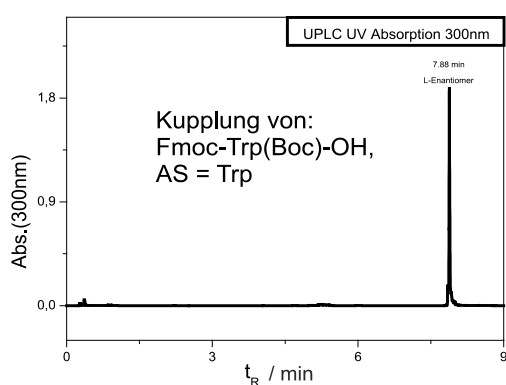
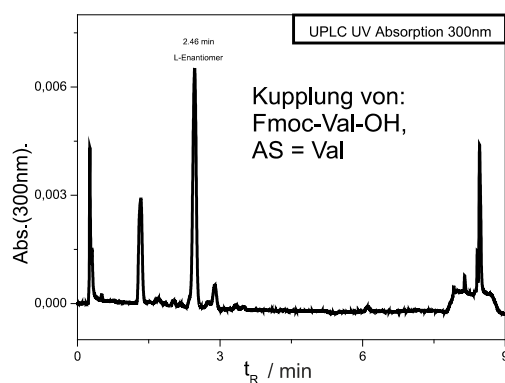
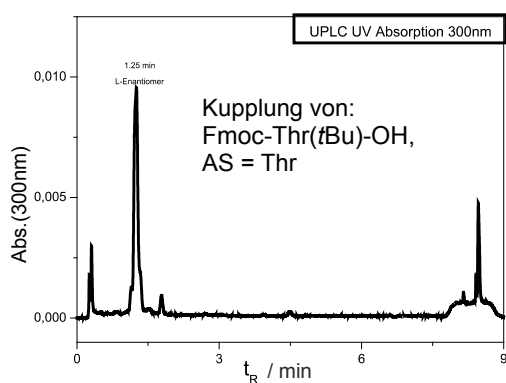
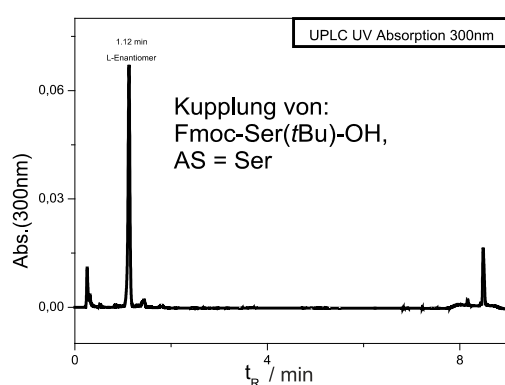
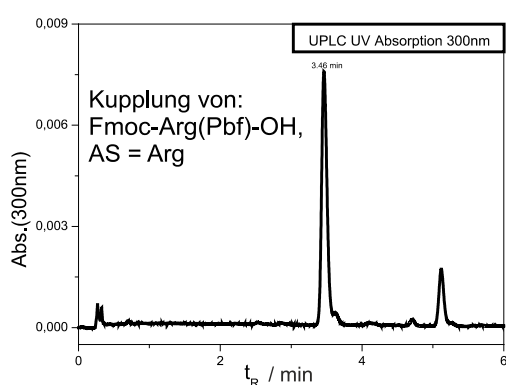
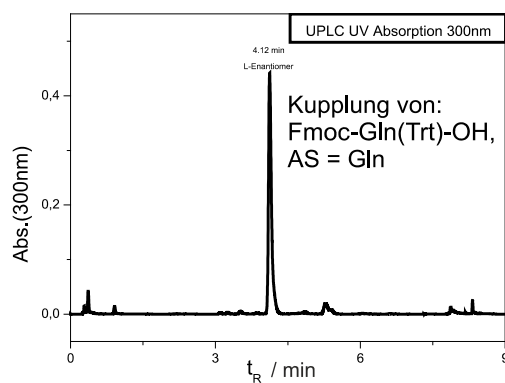
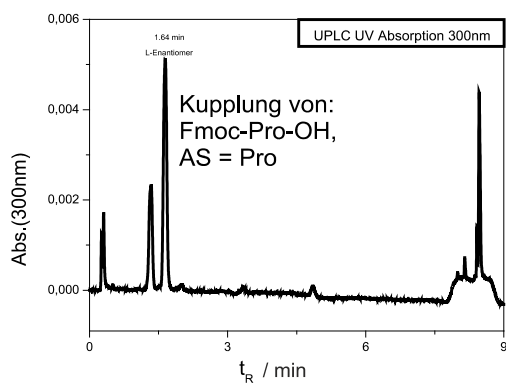


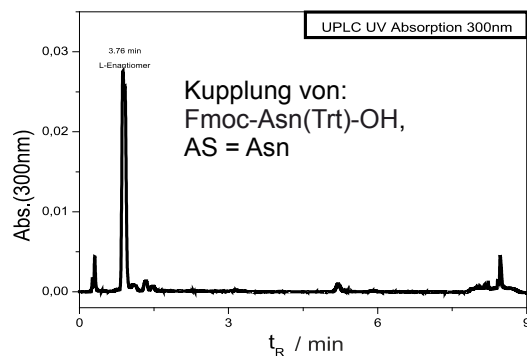
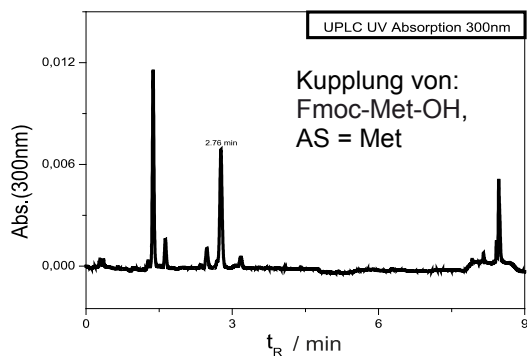
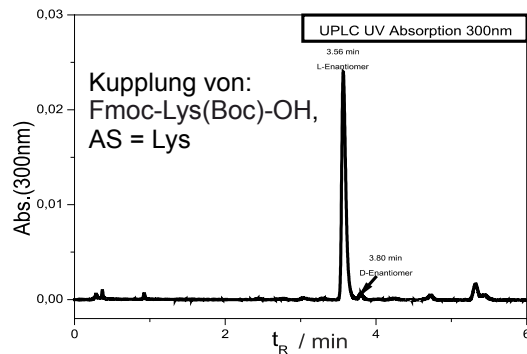
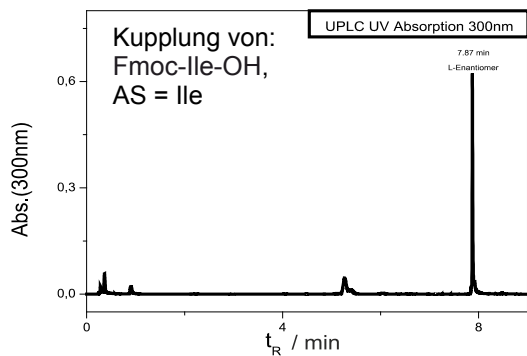
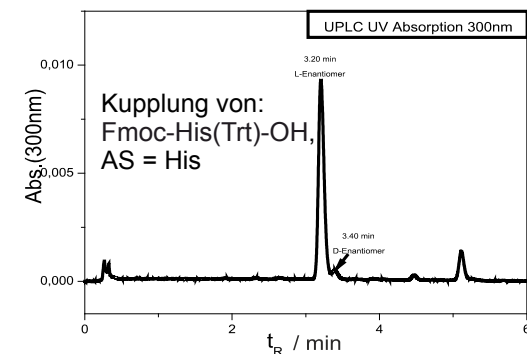
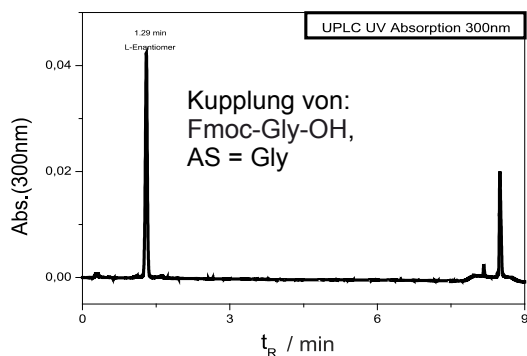
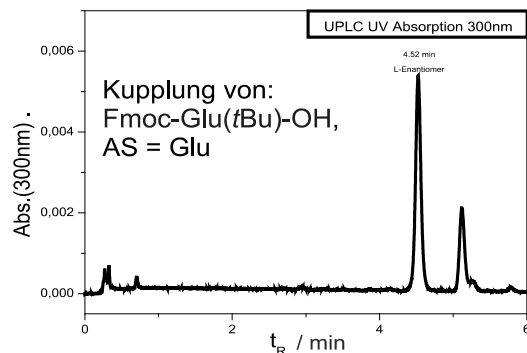
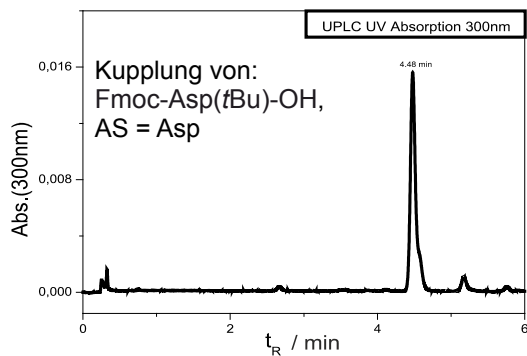
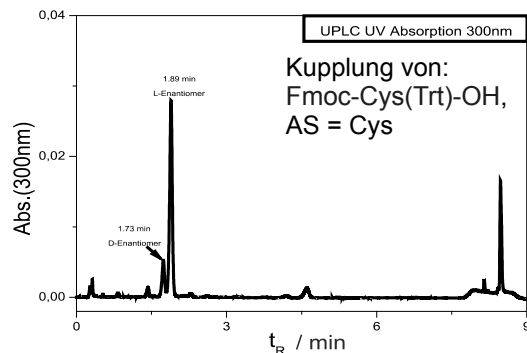
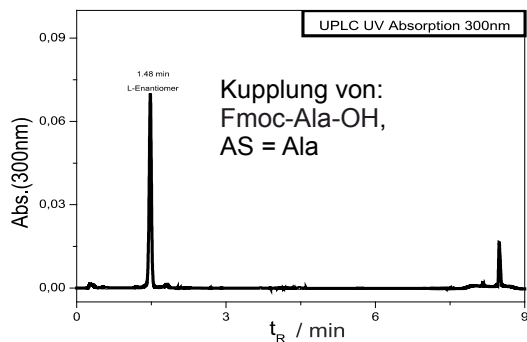
3BP1': H-APTMPPLPP-NH₂ (219)



ID: H-PAPKRNKPTVYGVSPNY-NH₂ (220)



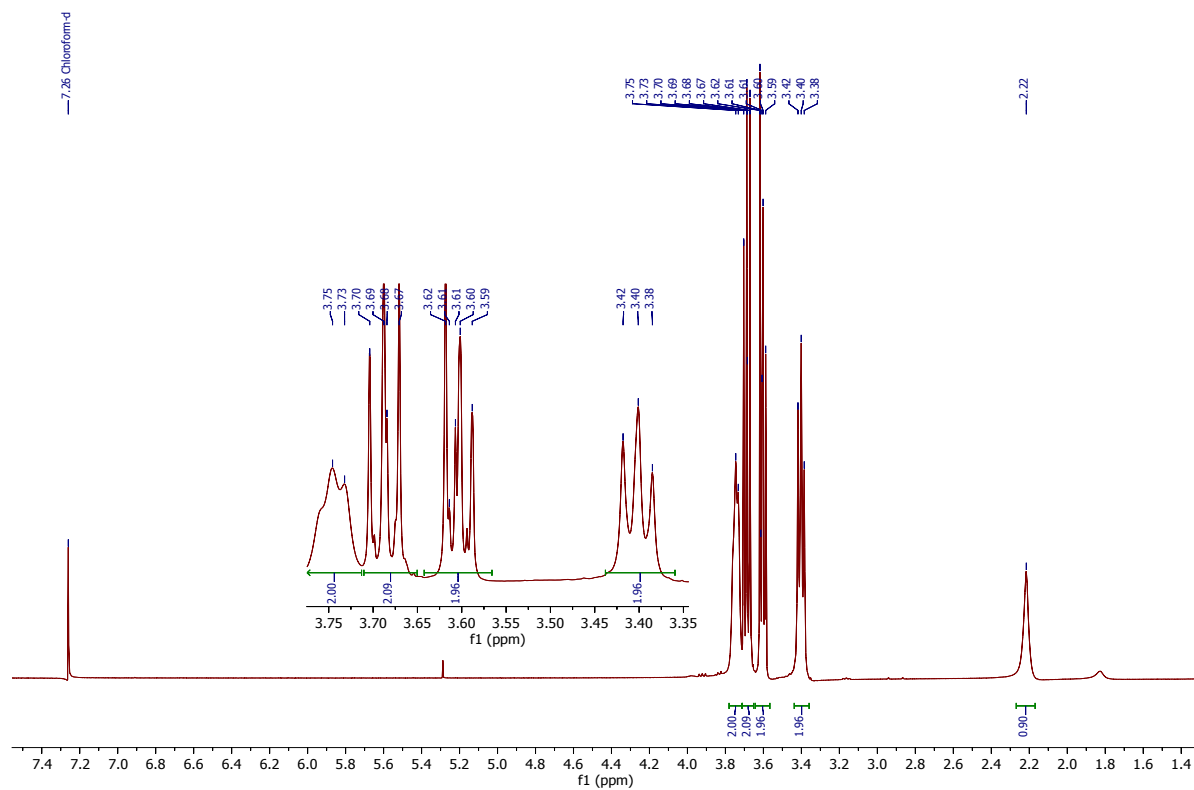
Chromatogramme der Erstbeladungsoptimierung: Fmoc-Glu-AA-NHSO₂-C₃H₆CO-Glu-Tyr-NH₂



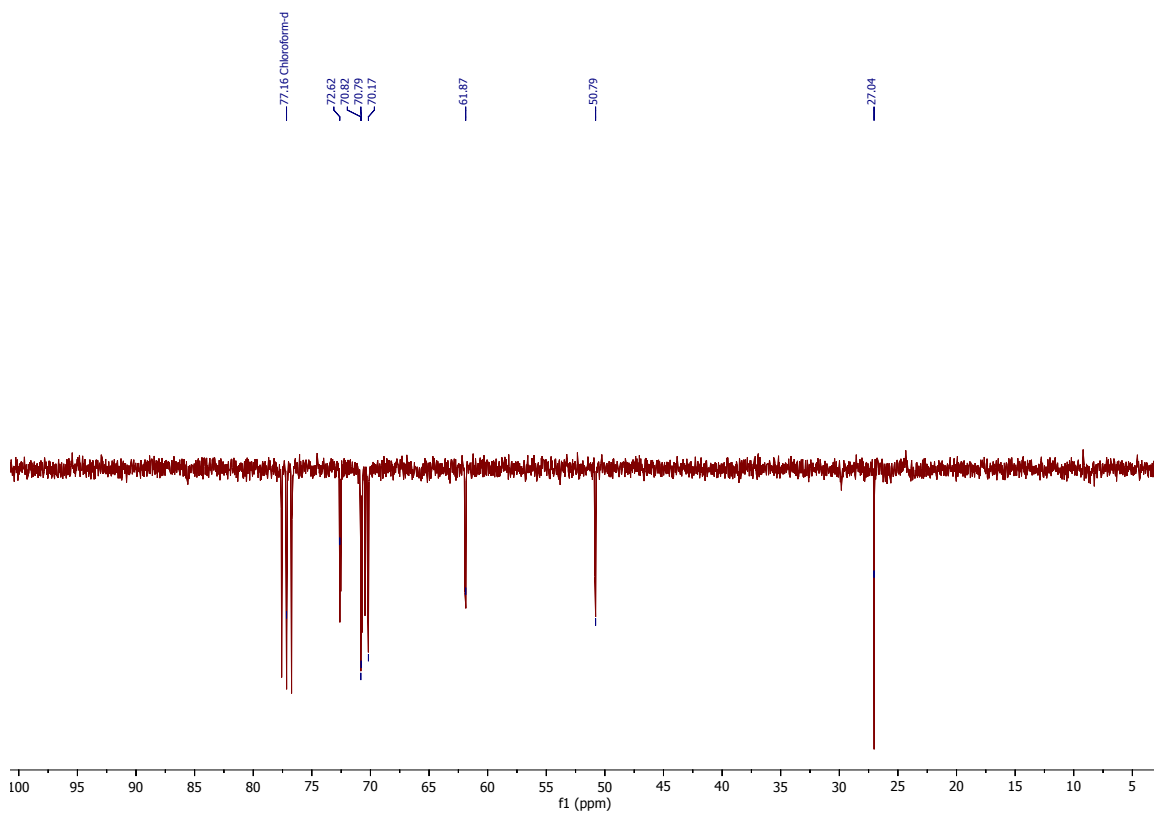
10.2 NMR-Spektren neuer organischer Verbindungen

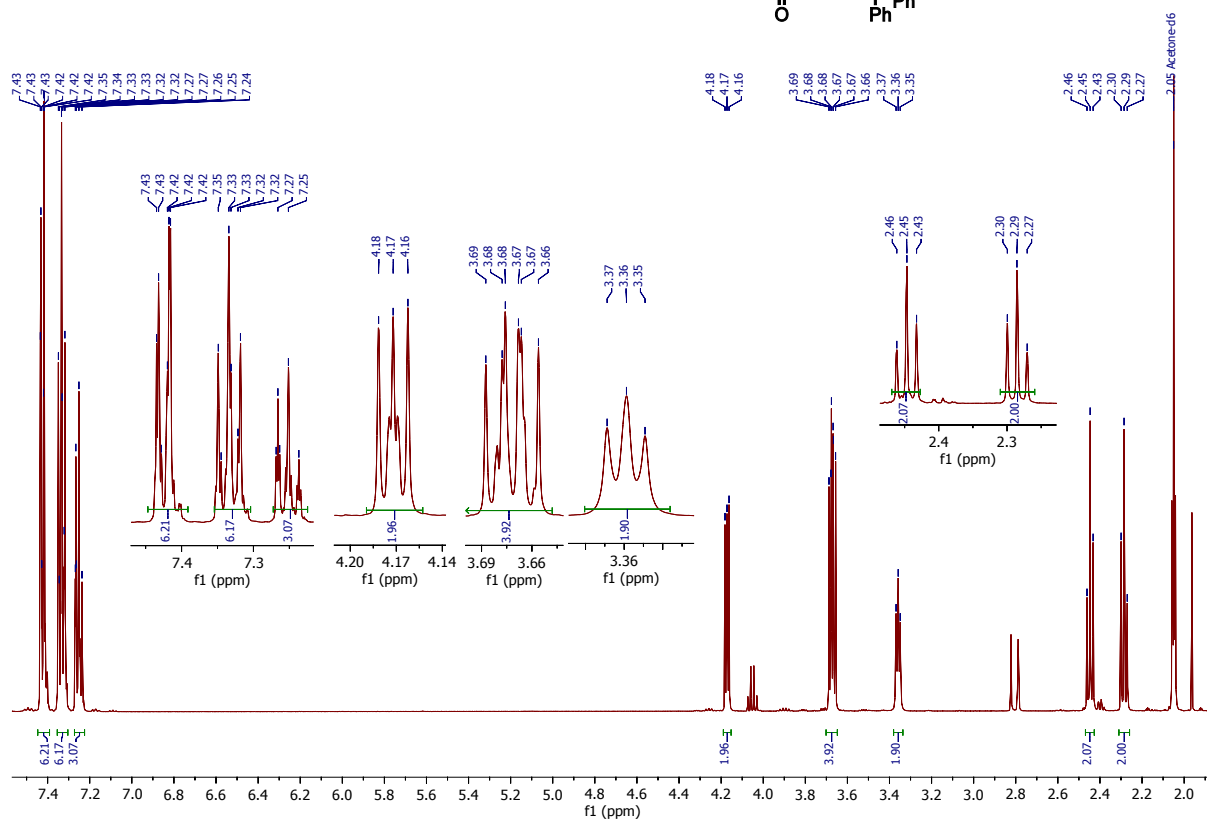
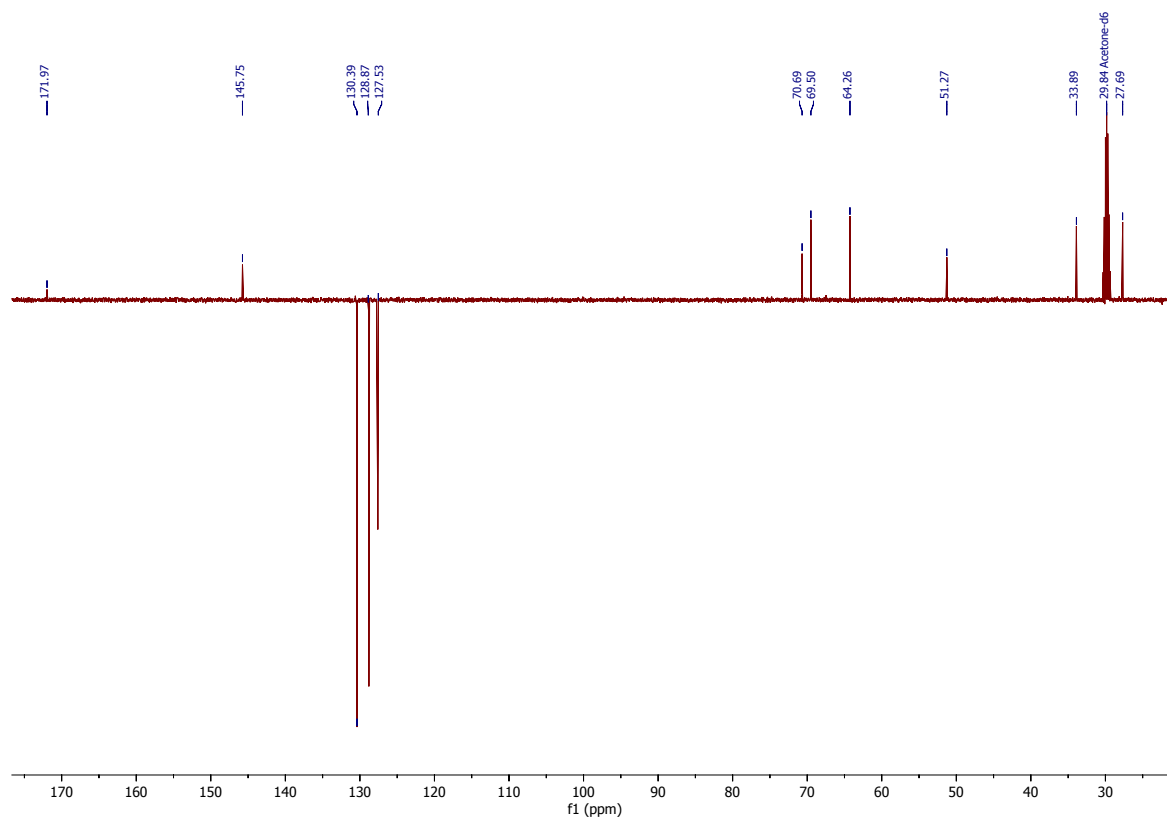
2-(2-azido-ethoxy)-ethanol (96) N=[N+]=[N-]CCOCCO

^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3 , 25°C):



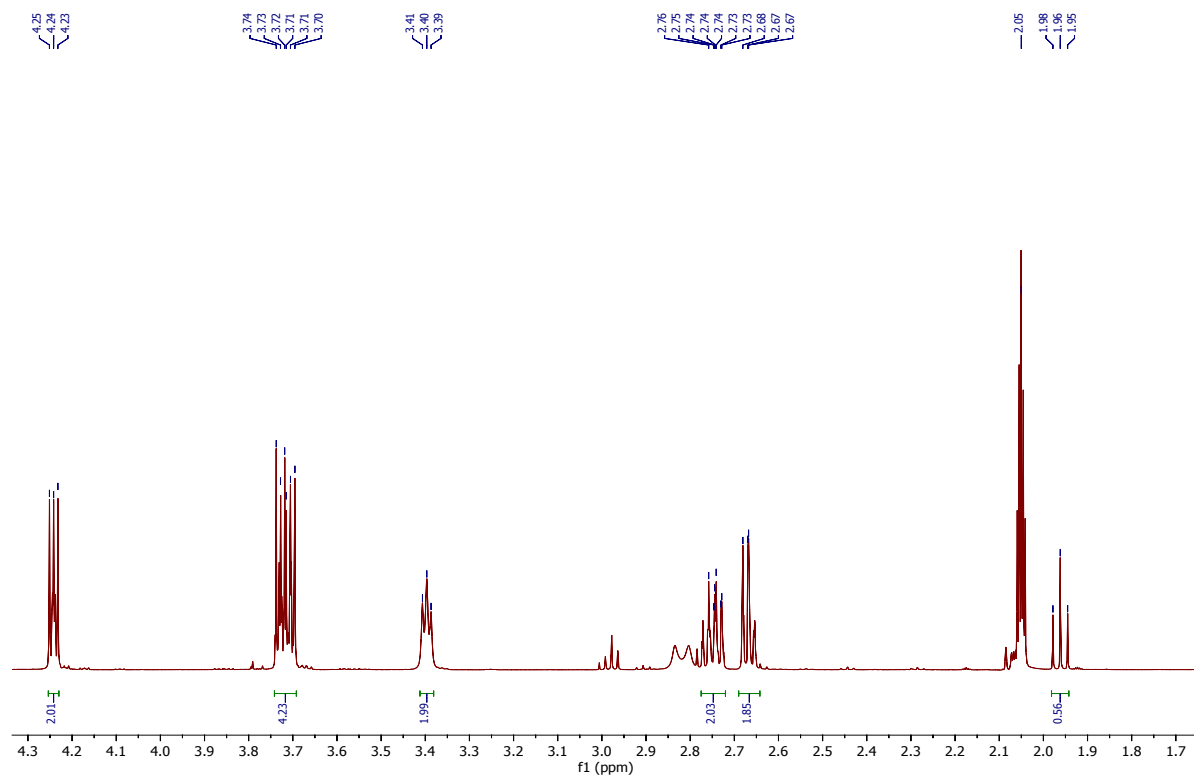
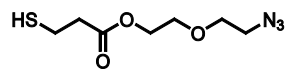
^{13}C -NMR (APT, 75 MHz, CDCl_3 , 25°C):



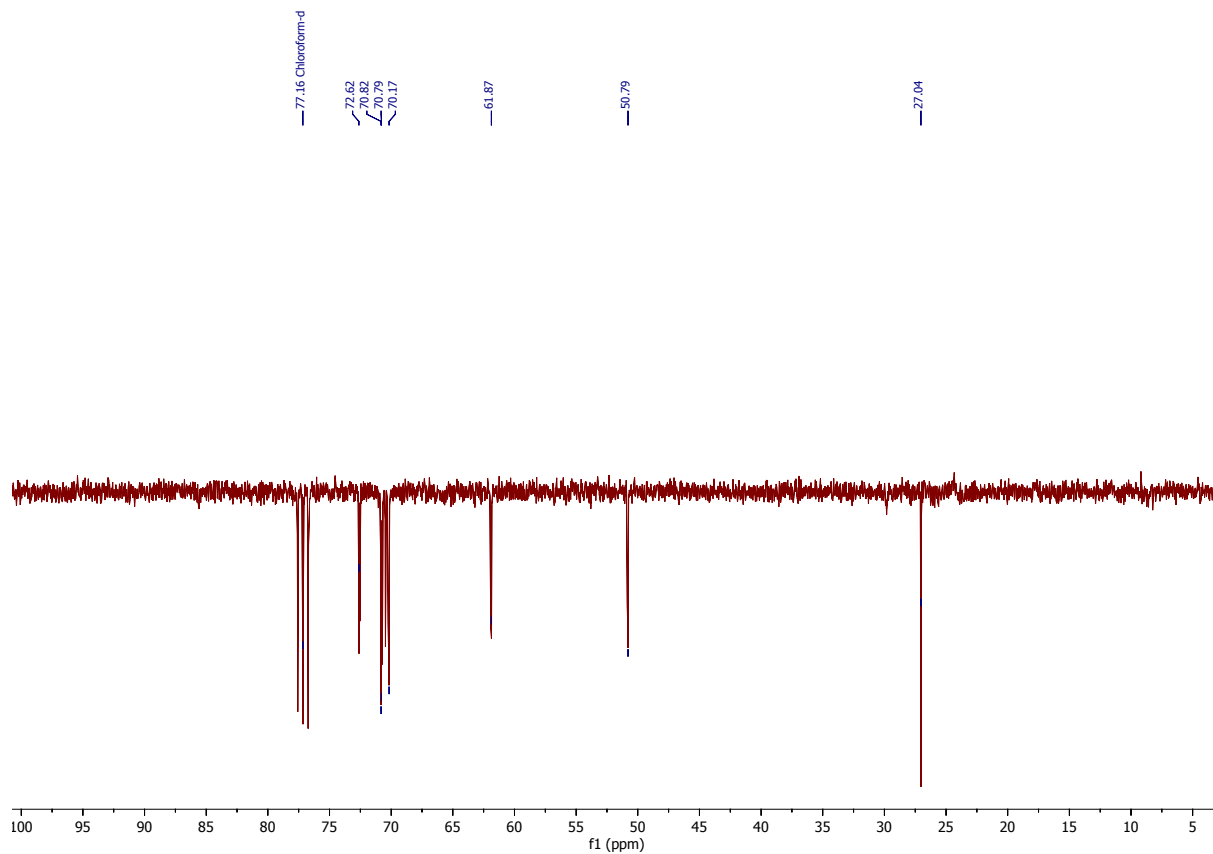
S-Trityl-2-(2-azidoethoxy)ethyl-3-mercaptopropanoat(98)¹H-NMR (500 MHz, Aceton-d₆, 25°C): N=[N+]#NCCOCCOC(=O)CCSC(C1=CC=CC=C1)(C1=CC=CC=C1)C1=CC=CC=C1¹³C-NMR (APT, 125.1 MHz, Aceton-d₆, 25°C):

2-(2-azidoethoxy)ethyl-3-mercaptopropanoat (99)

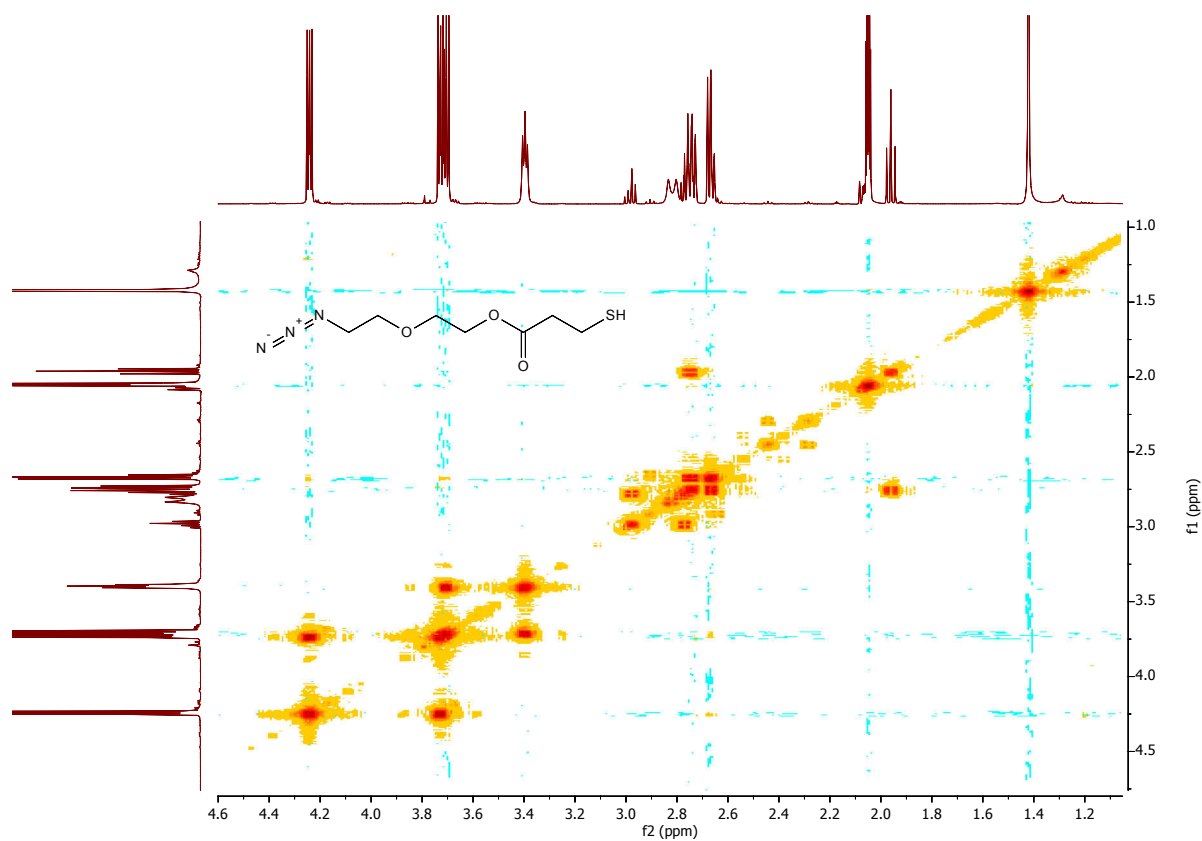
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Aceton- d_6 , 25°C):



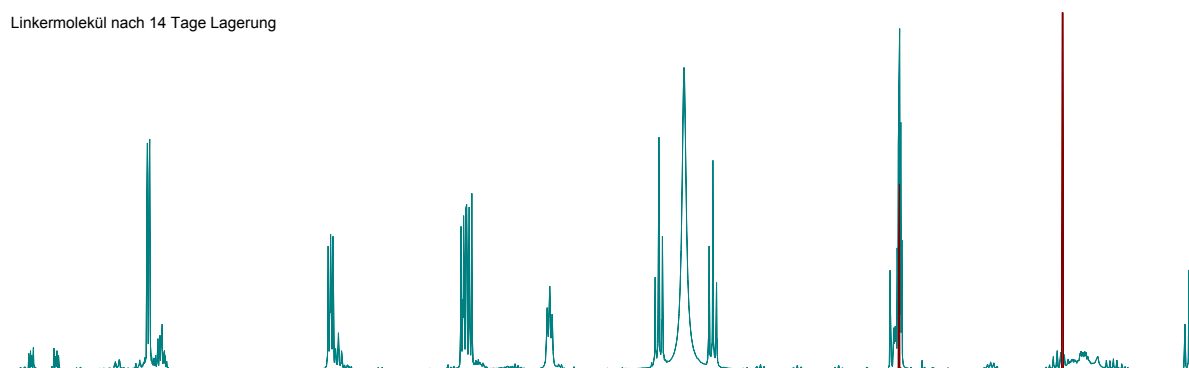
$^{13}\text{C-NMR}$ (125.1 MHz, Aceton- d_6 , 25°C):



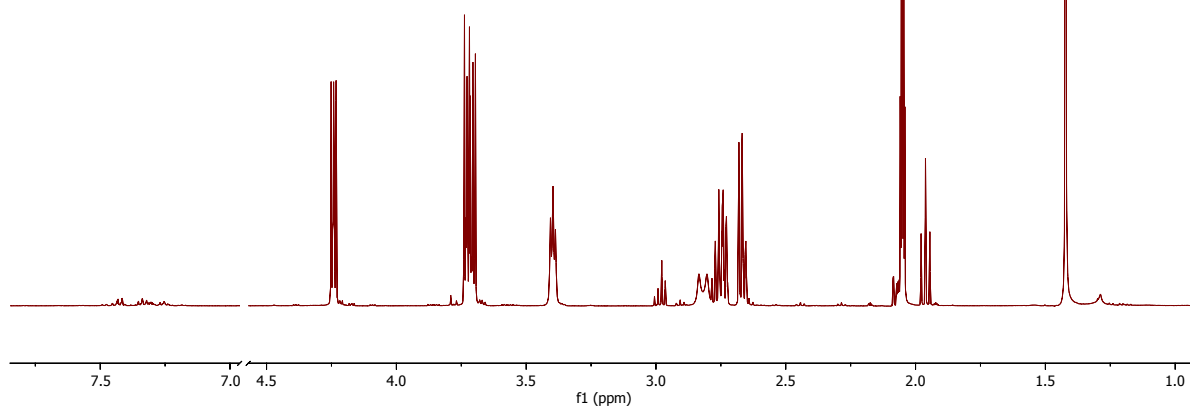
^1H -COSY-NMR (500 MHz, Aceton- d_6 , 25°C):



Linkermolekül nach 14 Tage Lagerung



Linkermolekül nach der Synthese



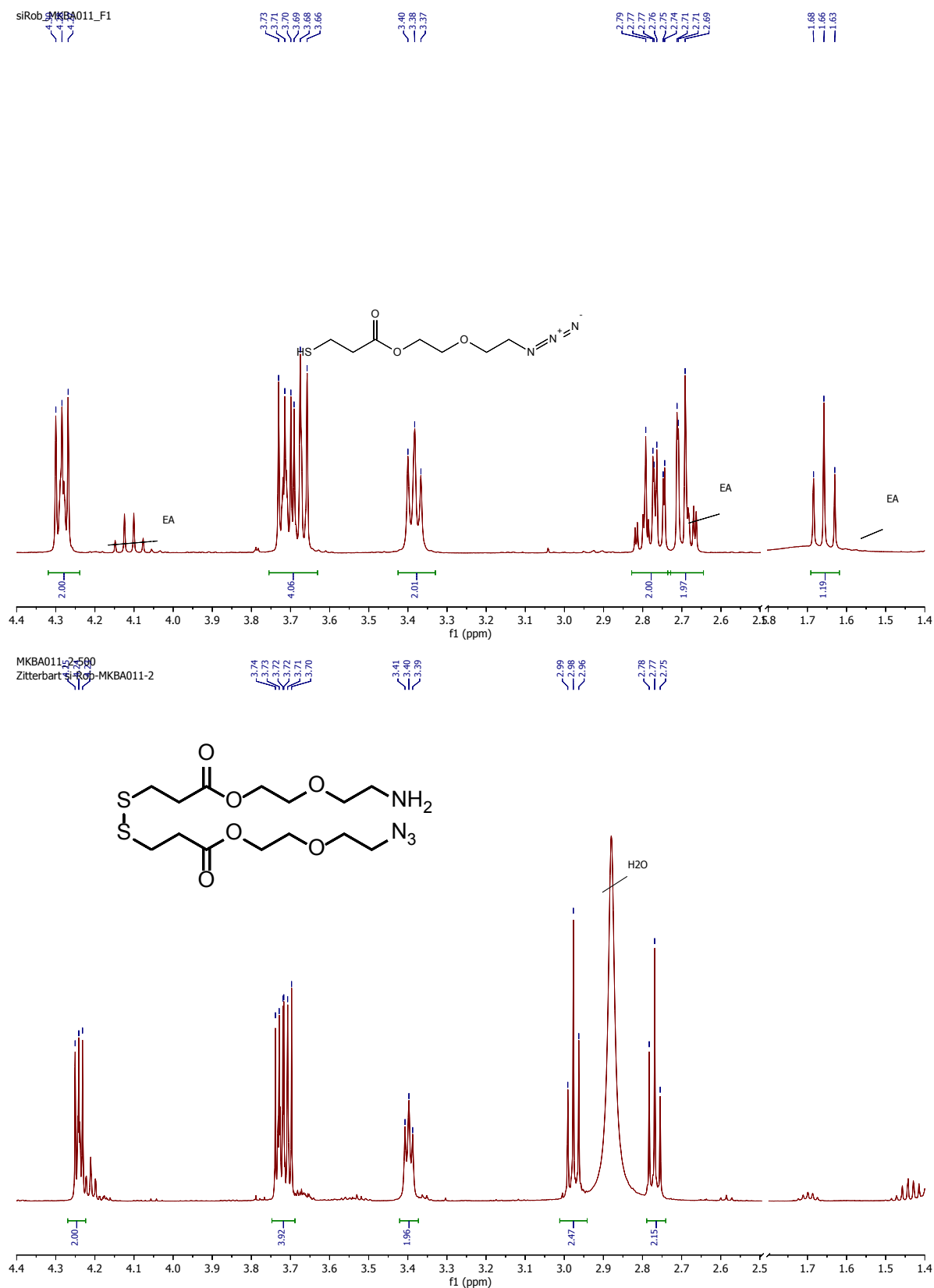
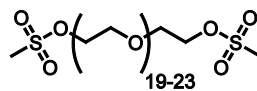
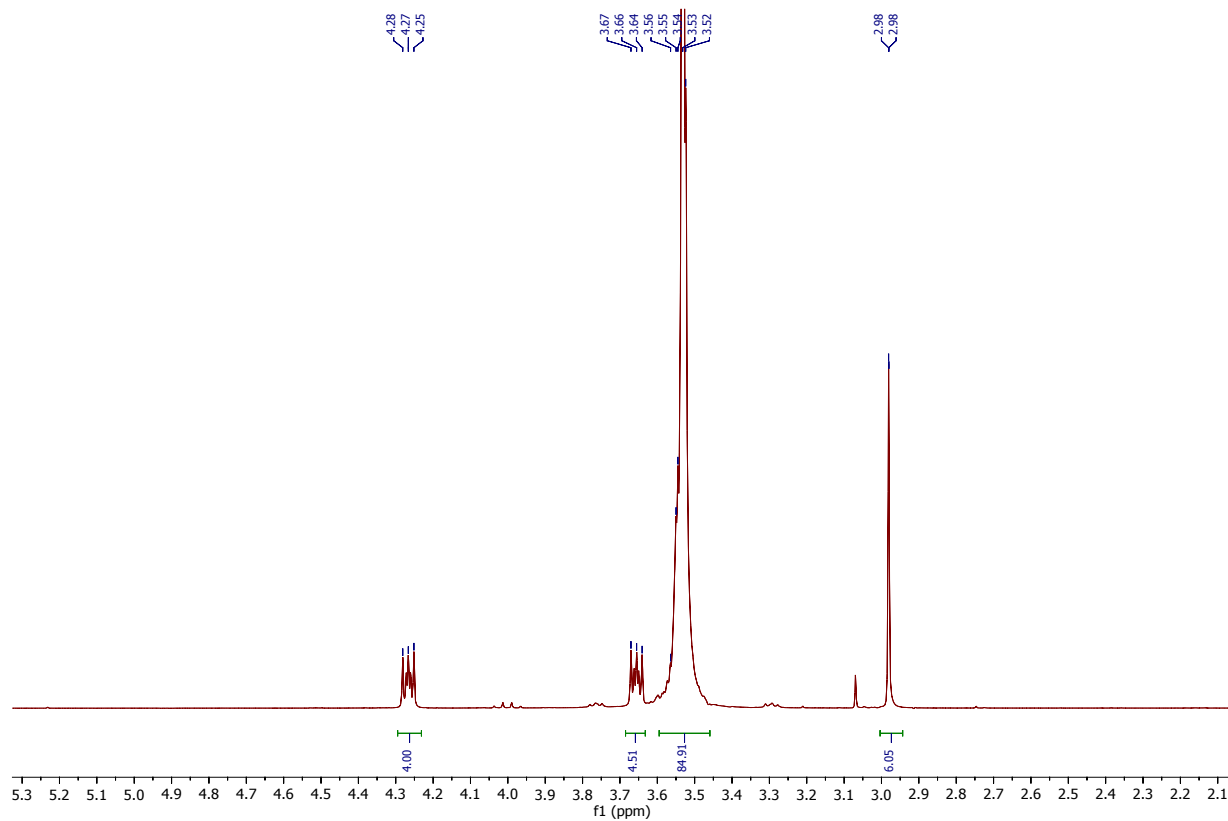
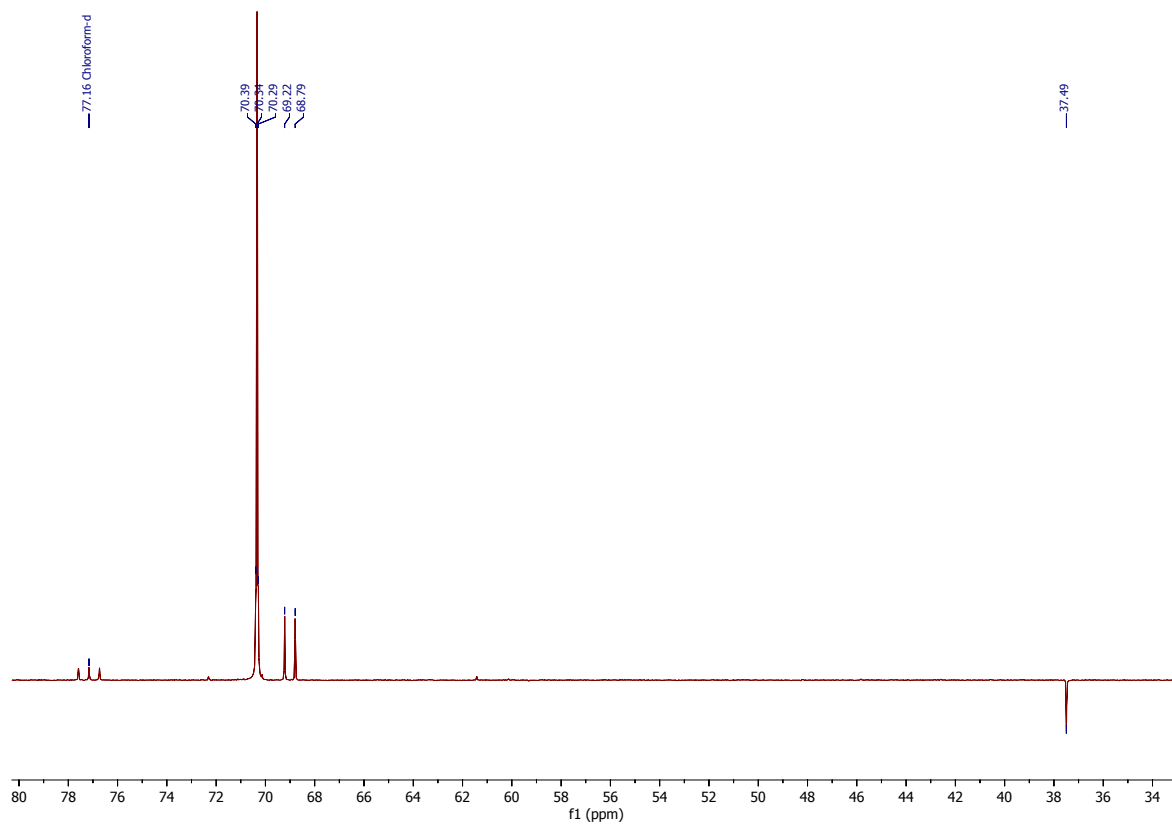
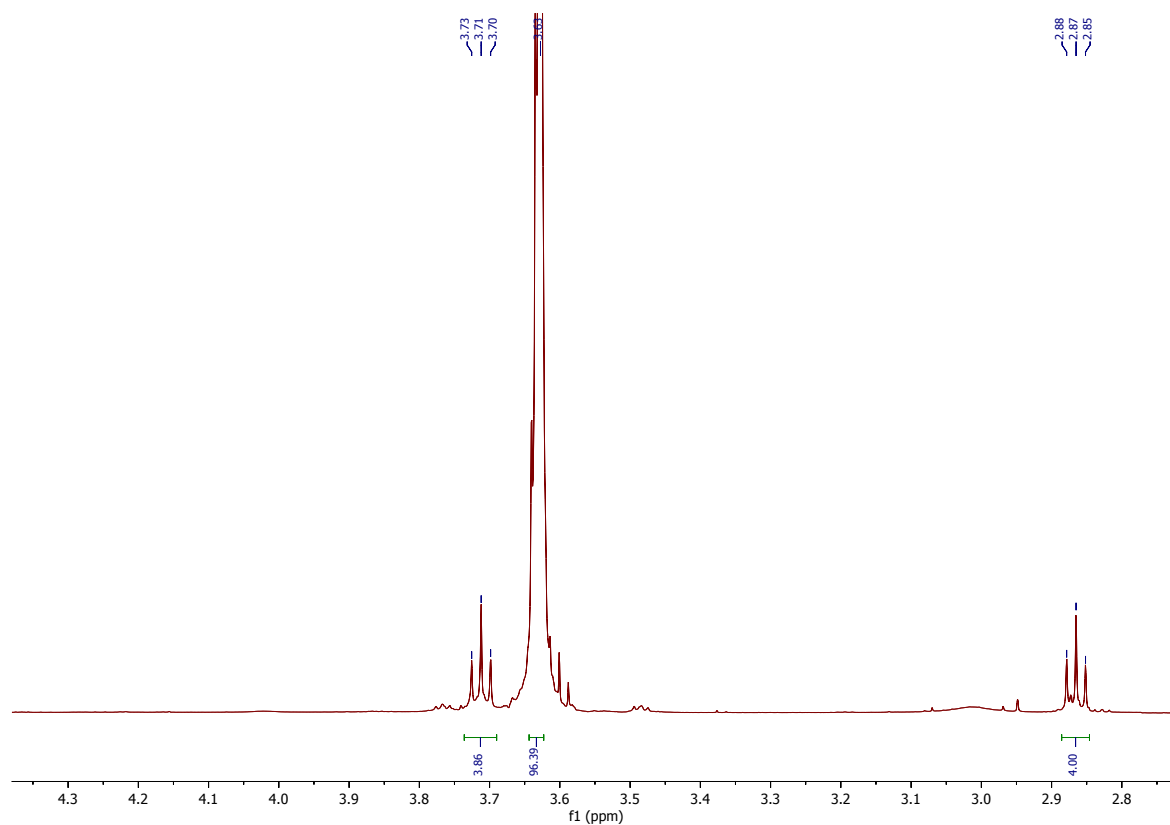
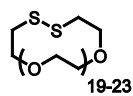


Abbildung 10.1: NMR-Vergleich des Azido-Thiol-Linkers **99** vor (oben) und nach (unten) der Lagerung (14 Tage) im Kühlschrank bei 8°C.

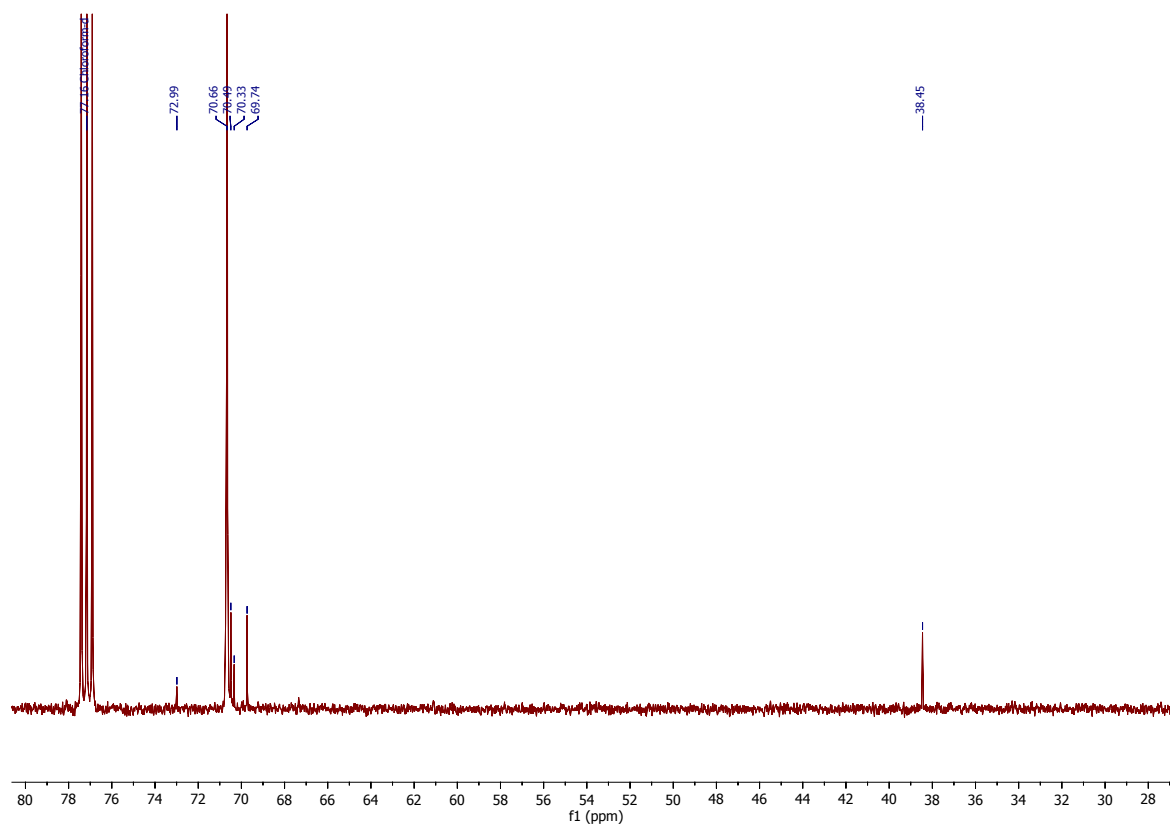
Oligoethylenglycol-dimethanesulfonate (139) ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3 , 25°C): ^{13}C -NMR (APT, 125 MHz, CDCl_3 , 25°C):

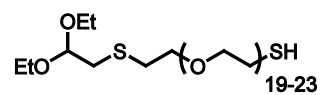
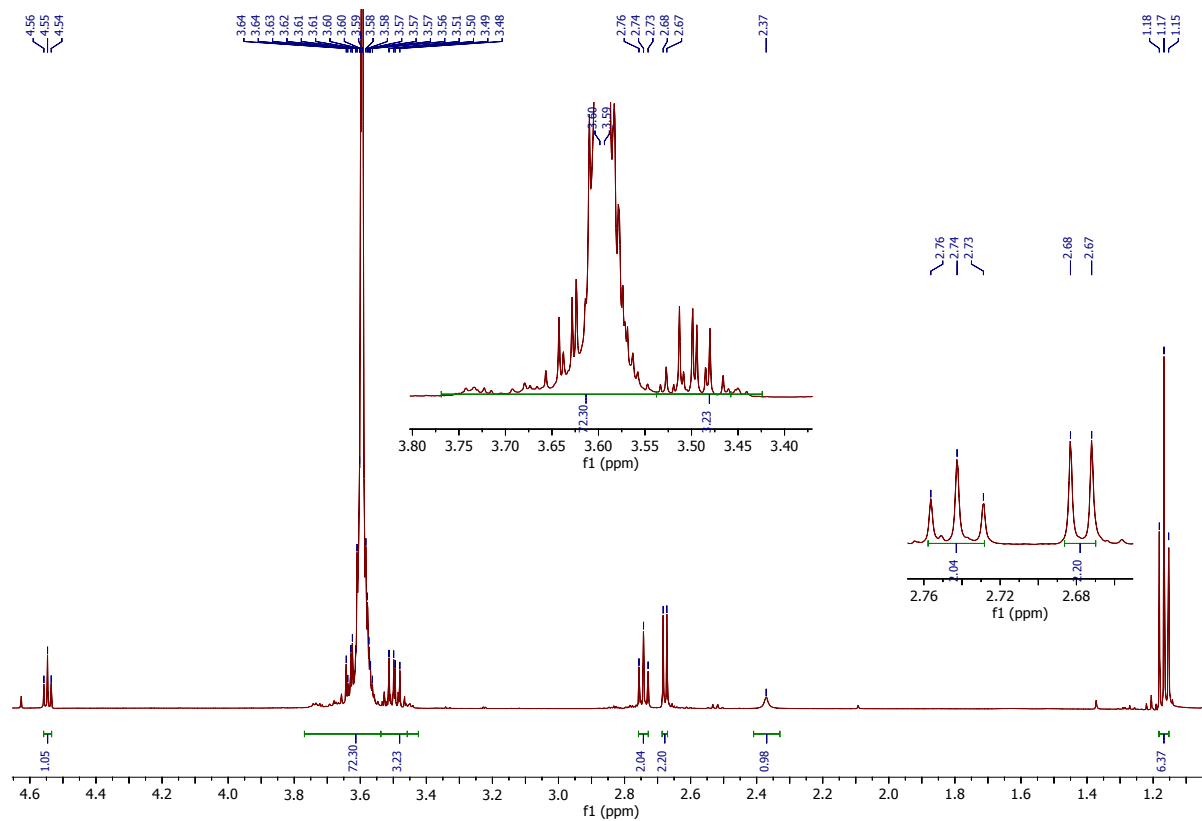
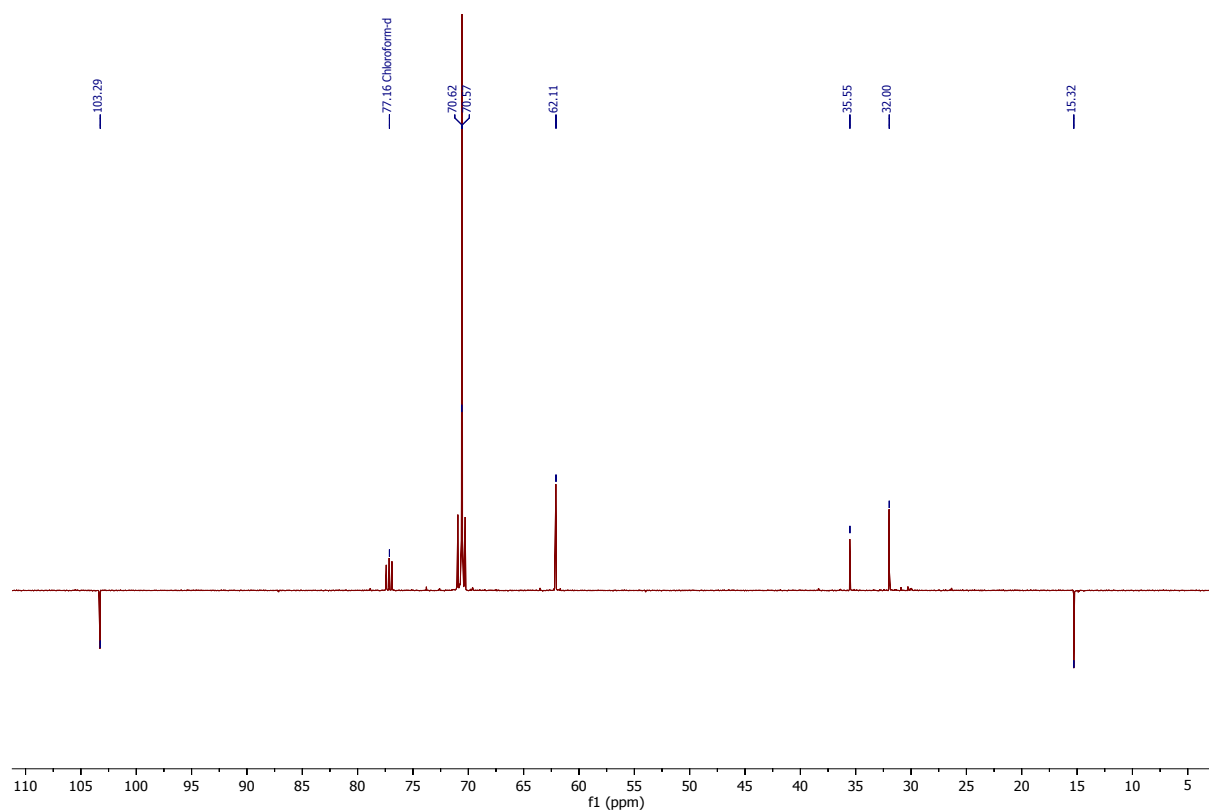
Oligoethylenglycol-disulfid (140)

^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3 , 25°C):

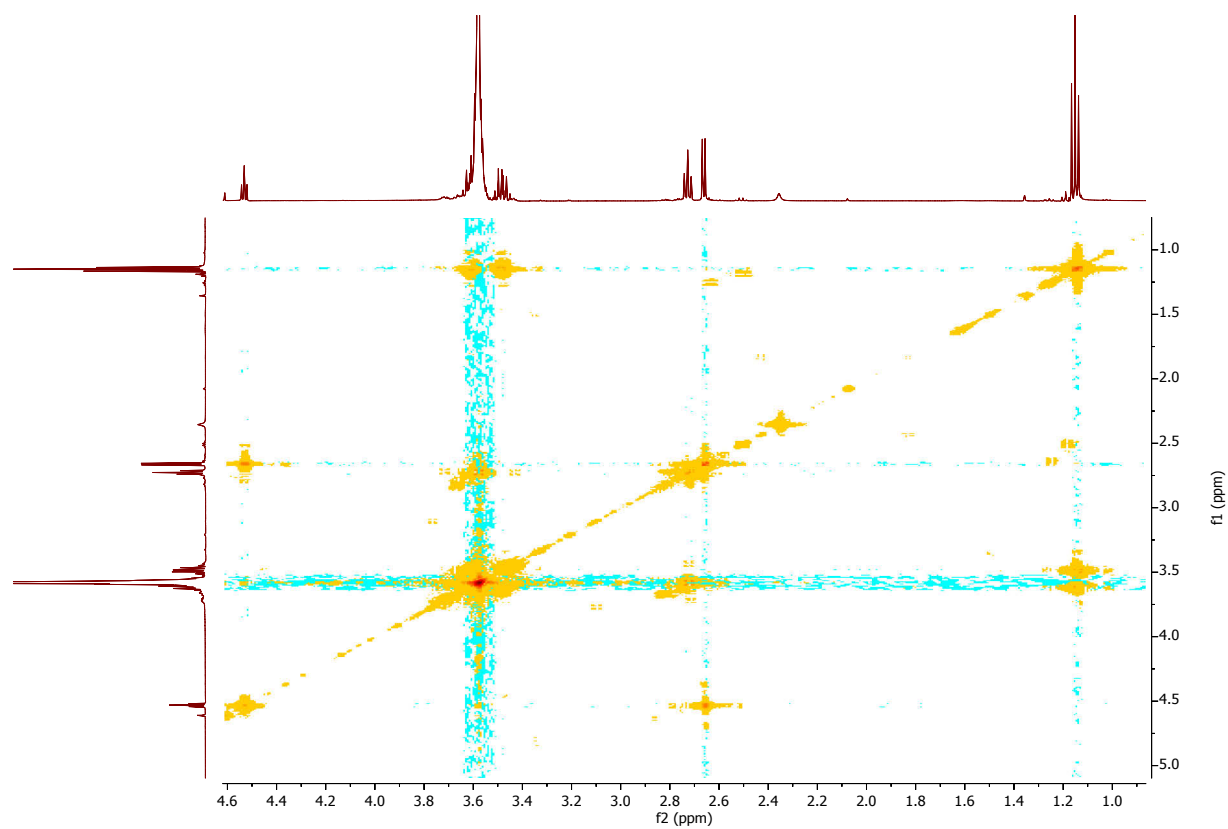


^{13}C -NMR (APT, 125 MHz, CDCl_3 , 25°C):

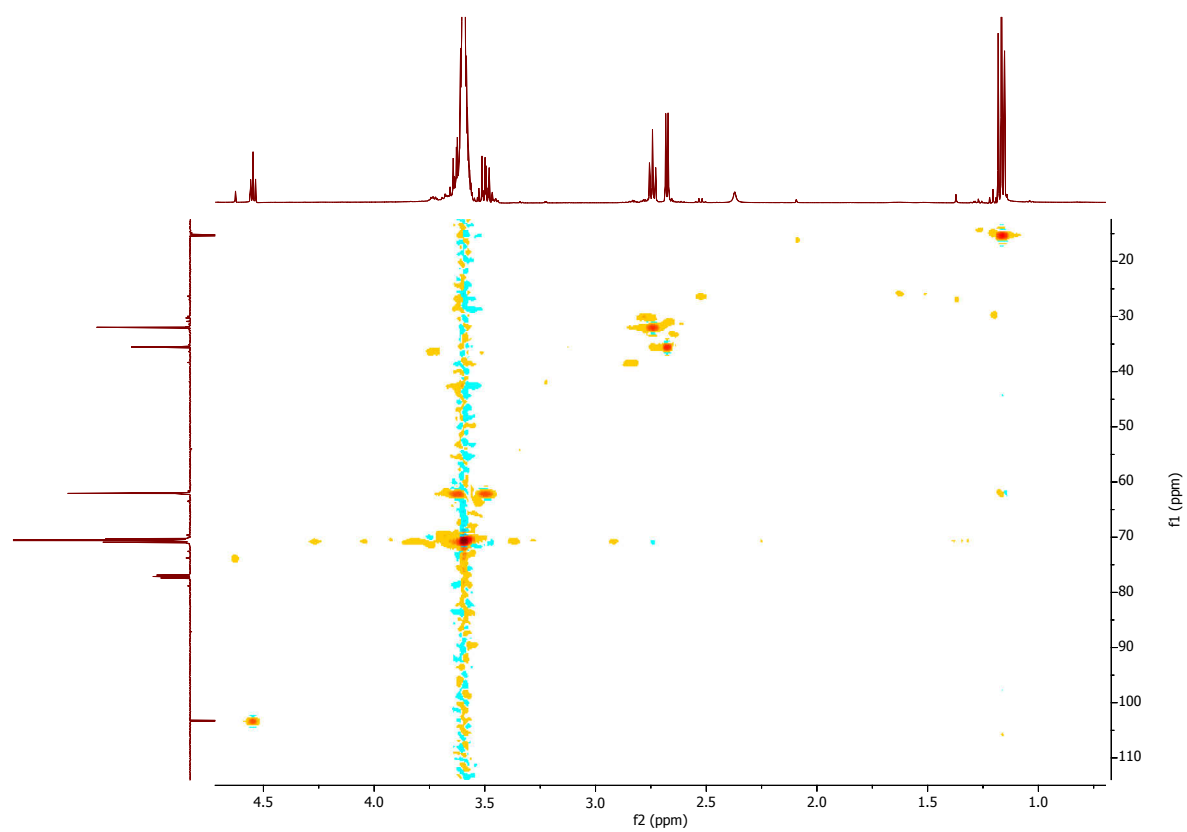


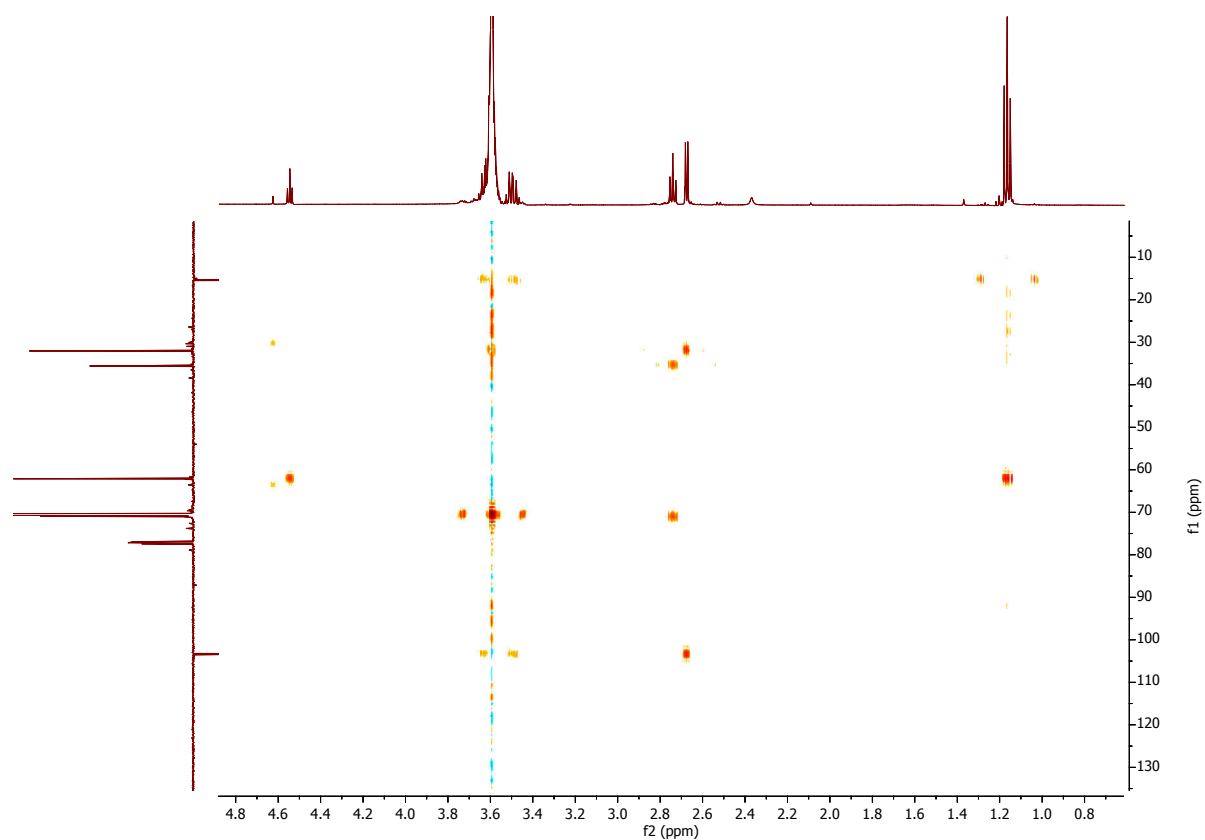
Diethoxyethylthio-oligoethylenoxy-ethyl mercaptan (141)¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, 25°C):¹³C-NMR (APT, 125 MHz, CDCl₃, 25°C):

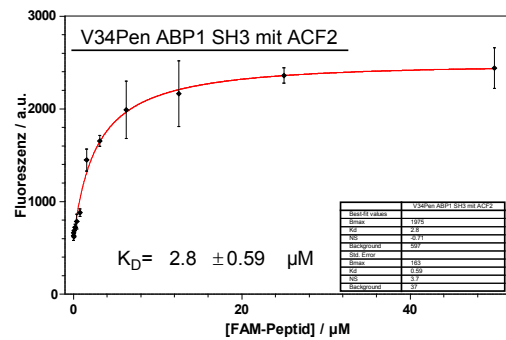
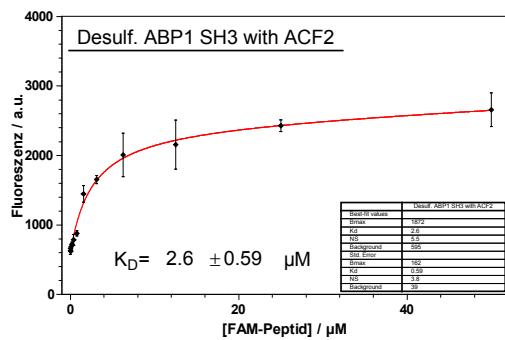
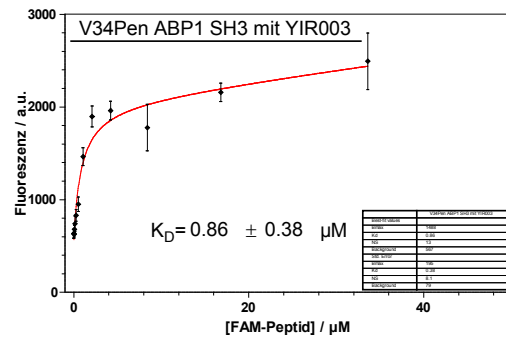
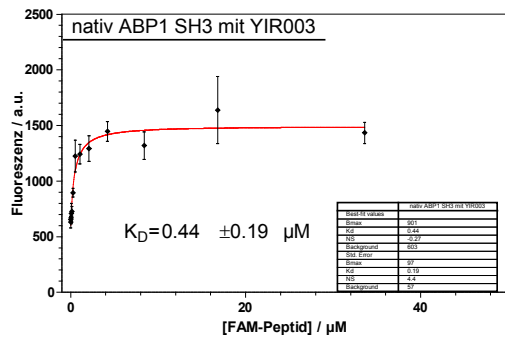
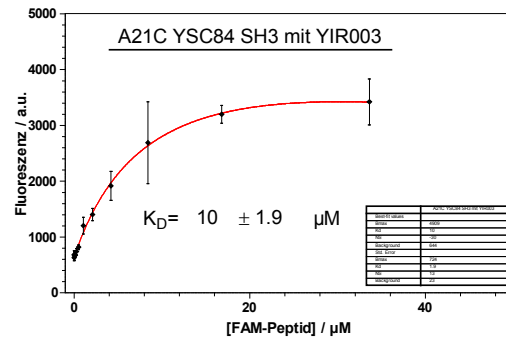
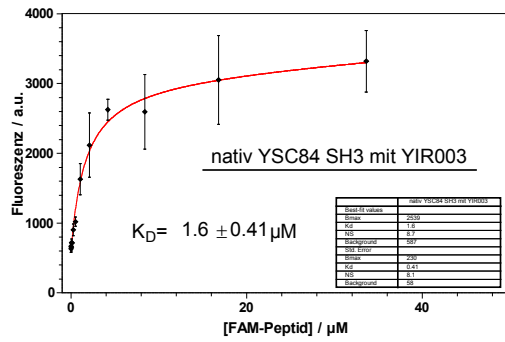
^1H -COSY-NMR (500 MHz, CDCl_3 , 25°C):



HSQC-NMR (CDCl_3 , 25°C):



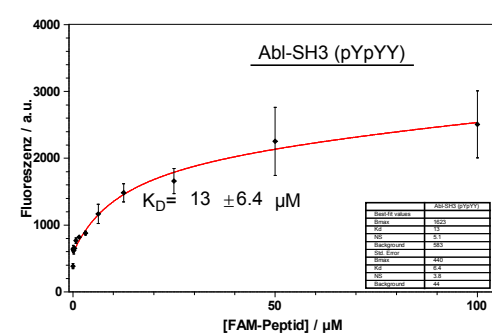
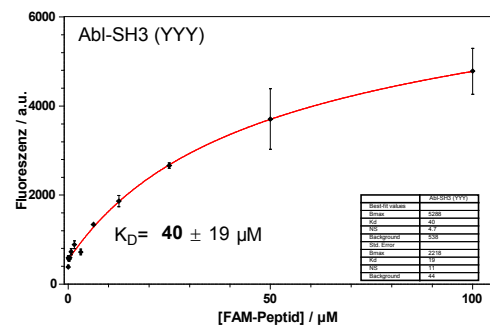
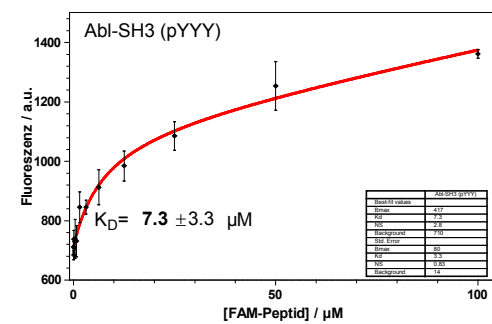
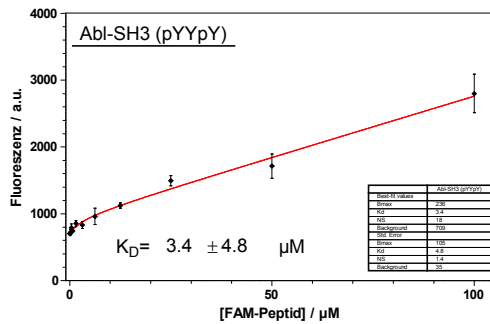
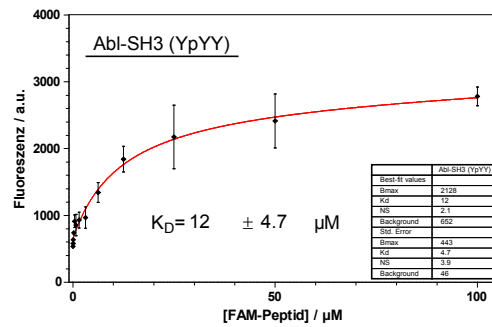
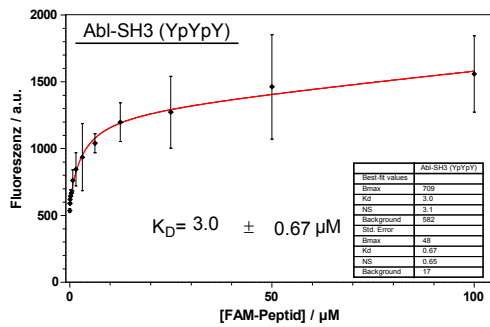
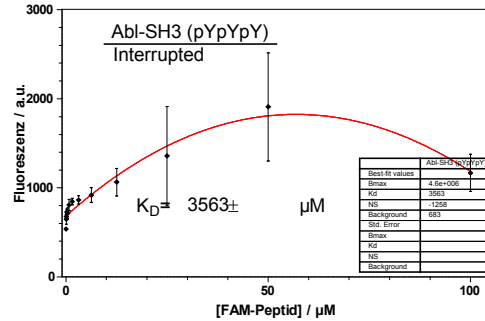
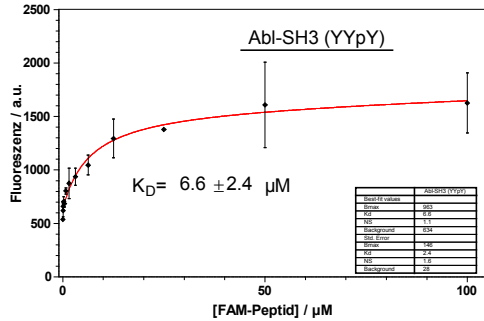
HMBC-NMR (CDCl_3 , 25°C):



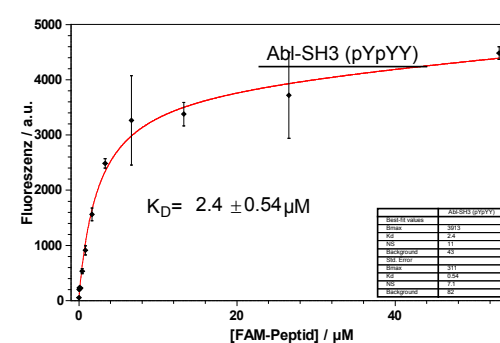
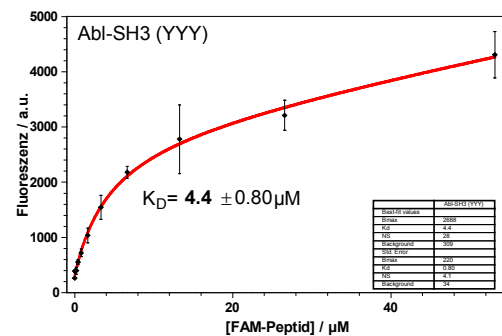
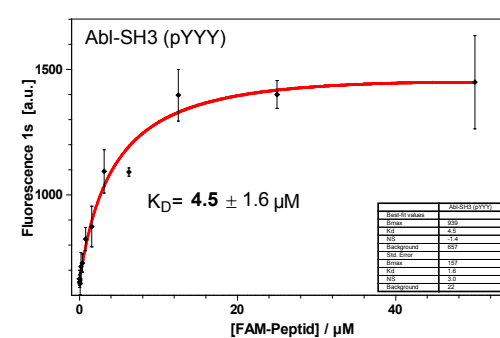
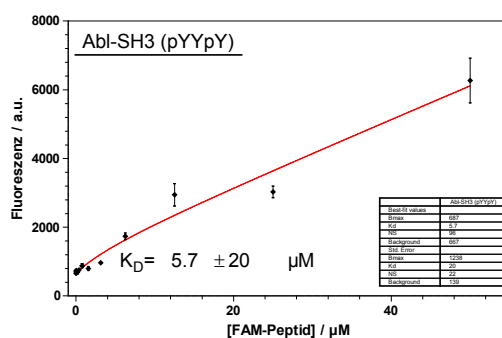
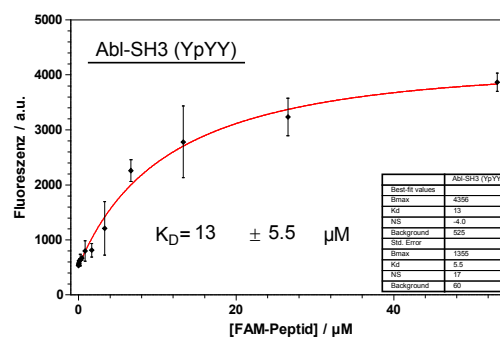
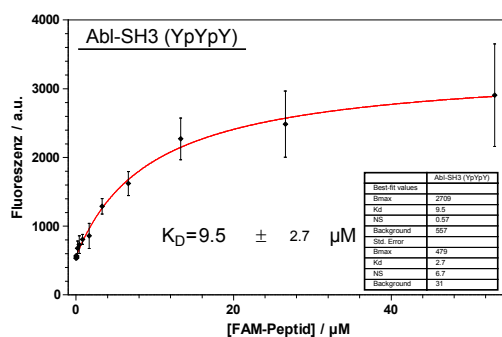
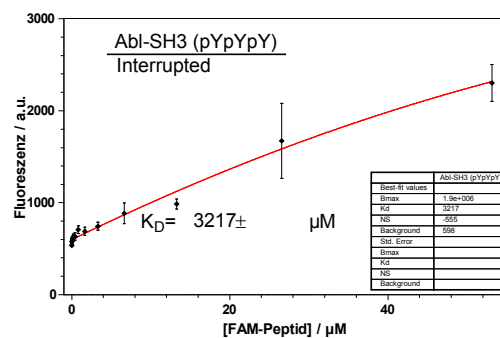
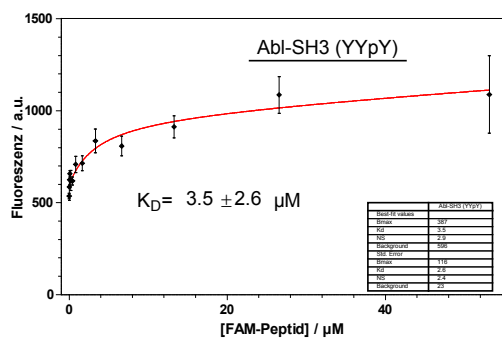
Oberflächen-Fluoreszenzsättigungs Analyse der entschweiften SH3-Domäne von YSC84 **149**, der A21C Mutante **150**, der SH3-Domäne von ABP1 **152** sowie der V34Pen Mutante **150** mit den FAM-markierten prolinreichen Bindern der ACF2 Sequenz **155** und der YIR003-Sequenz **156**.

Daten zu 4.5.2 Bindungsmessungen der Phosphoformen der Abl- und Arg-SH3-Domänen an der Oberfläche

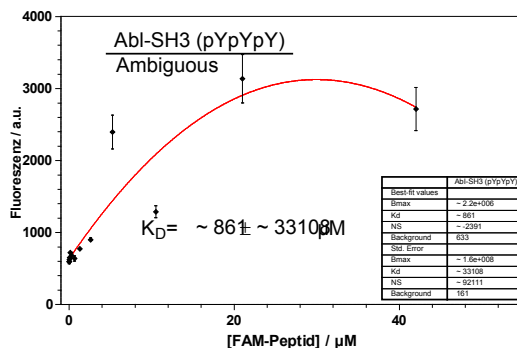
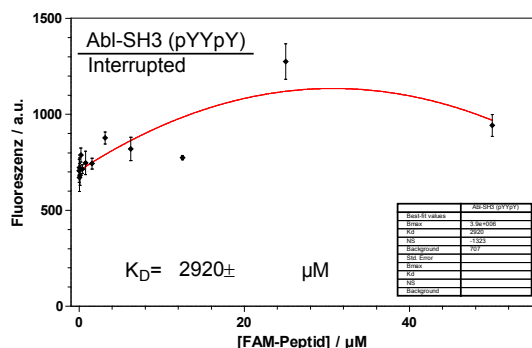
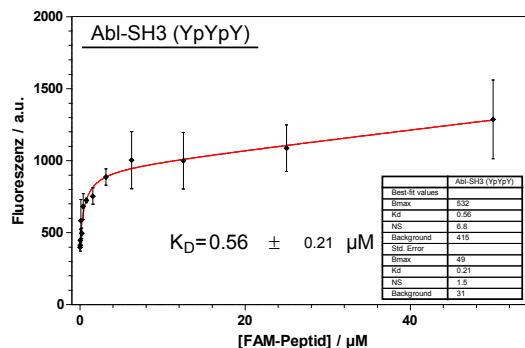
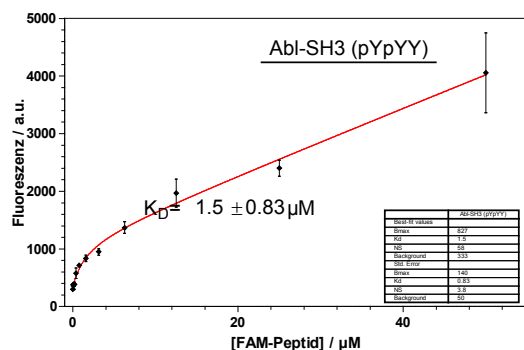
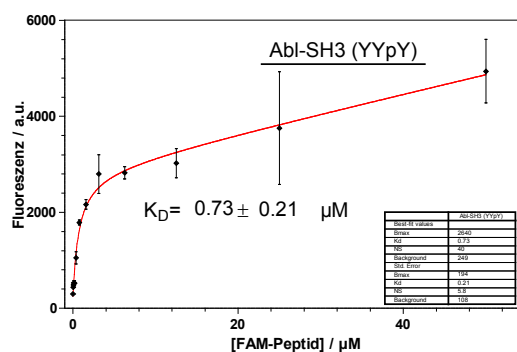
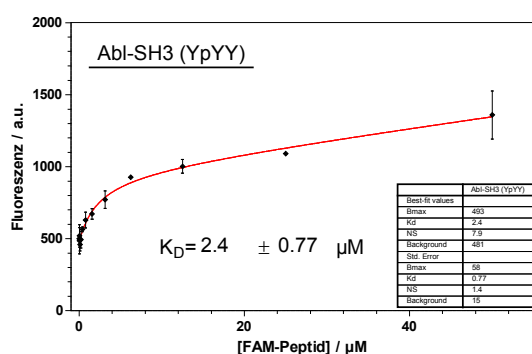
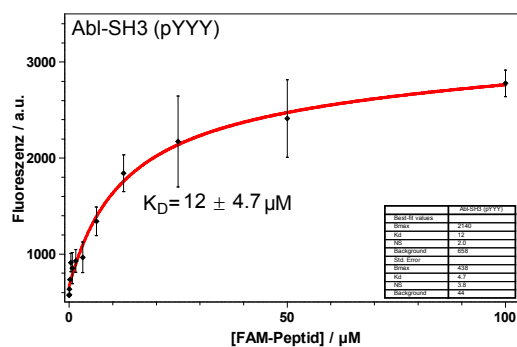
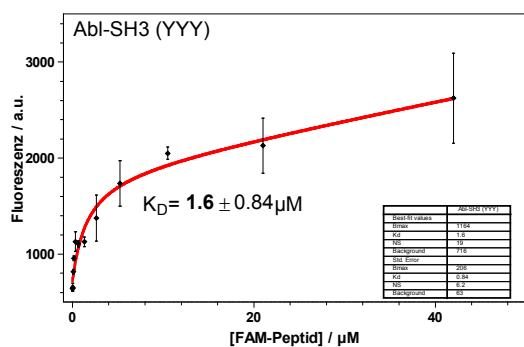
(Phospho)SH3-Domänen von Abl (181-188) auf der Oberfläche mit dem FAM-markierten Peptid von 3BP1 203:



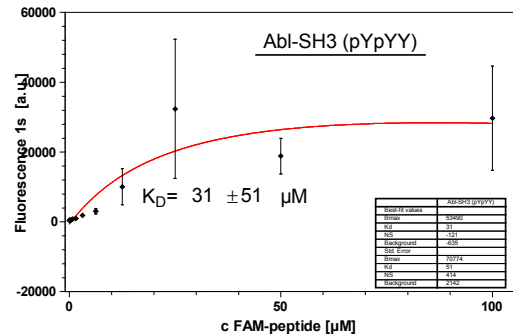
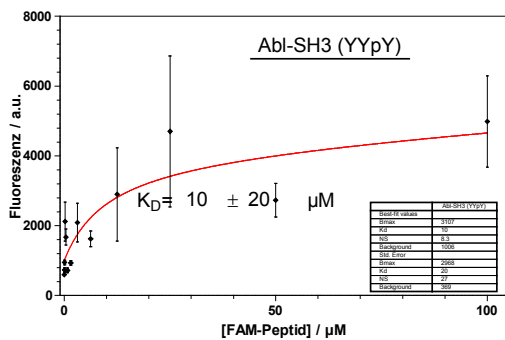
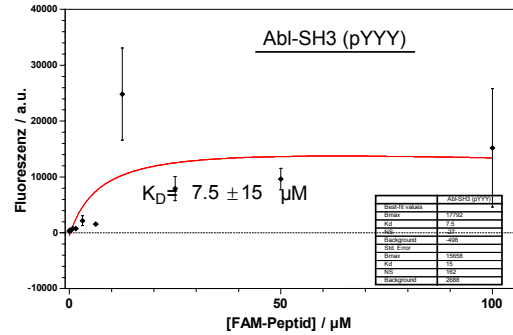
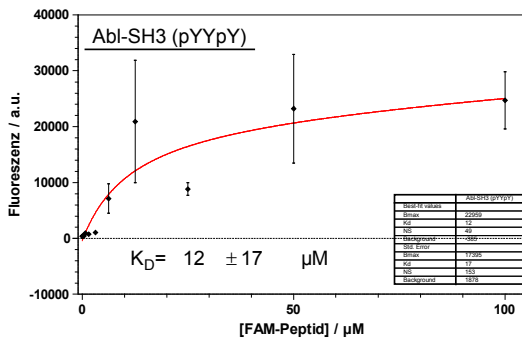
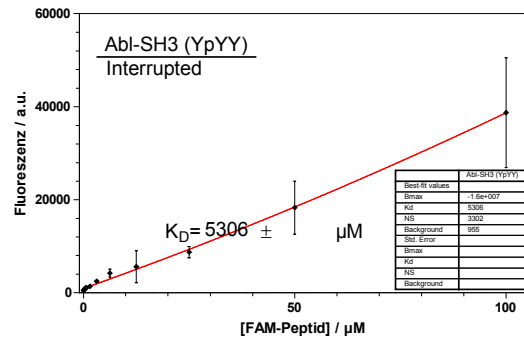
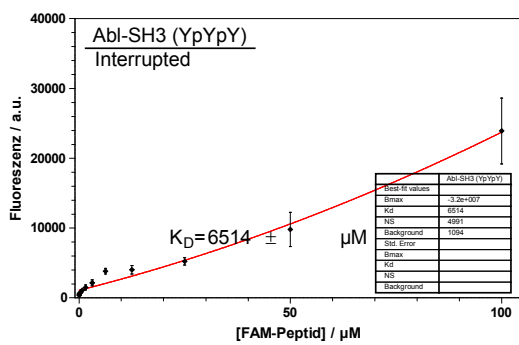
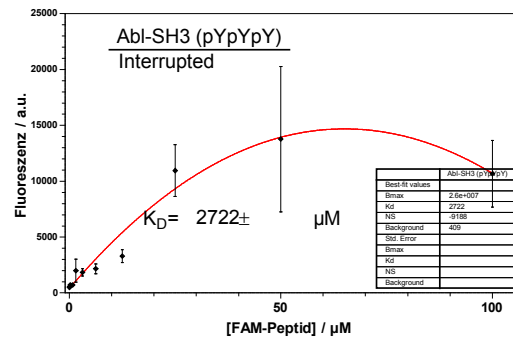
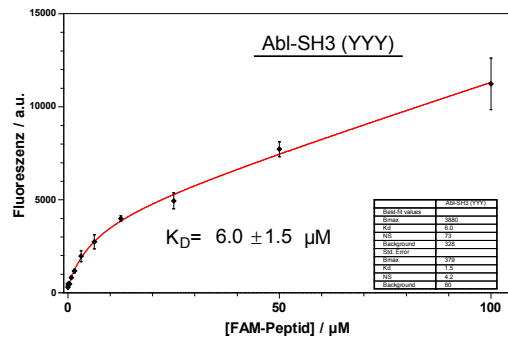
(Phospho)SH3-Domänen von Abl (181-188) auf der Oberfläche mit dem FAM-markierten Peptid von 3BP2 204:



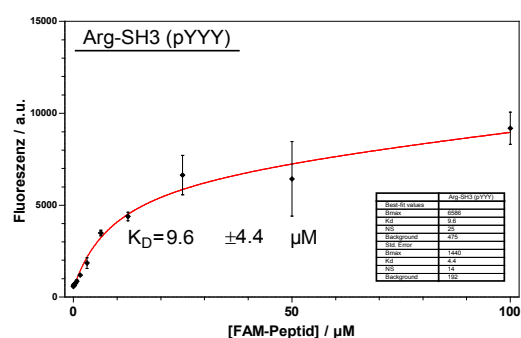
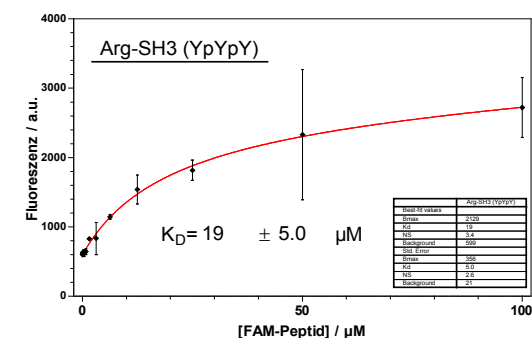
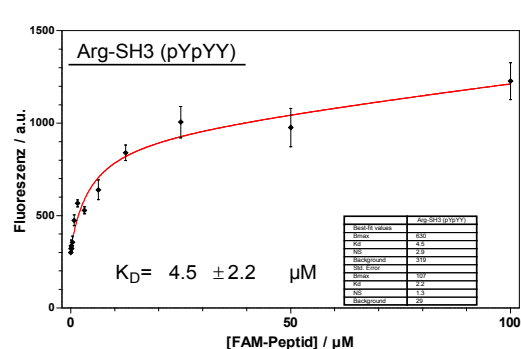
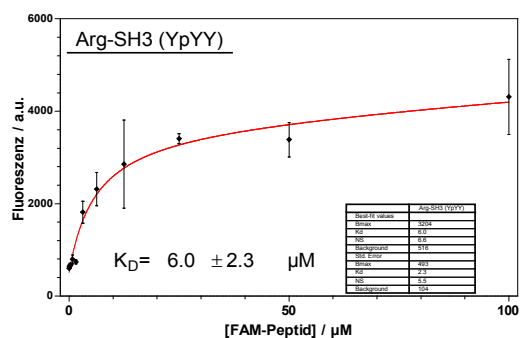
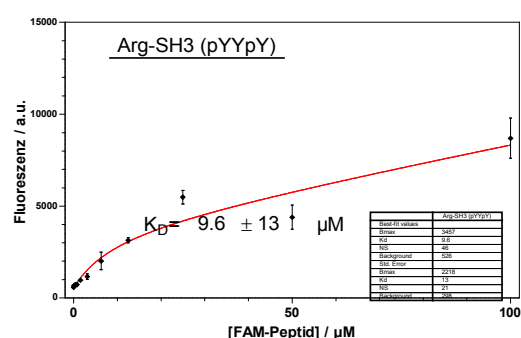
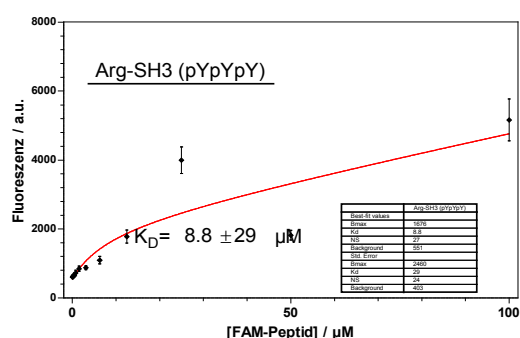
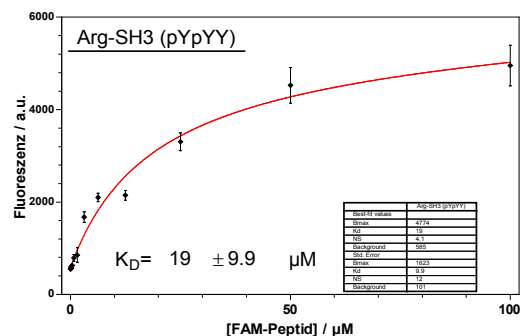
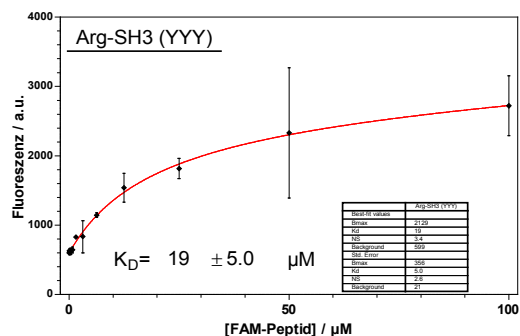
(Phospho)SH3-Domänen von Abl (181-188) auf der Oberfläche mit dem FAM-markierten Peptid p41 205:



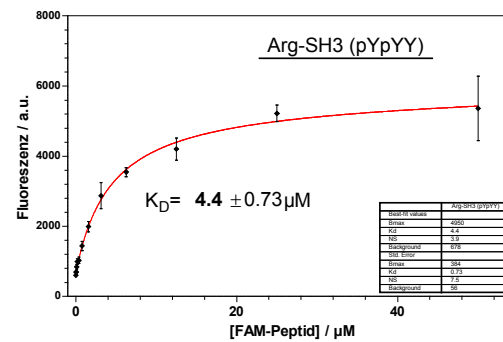
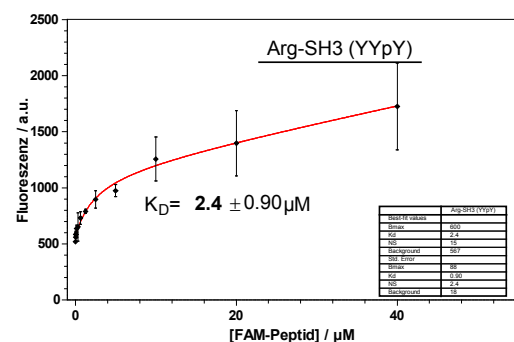
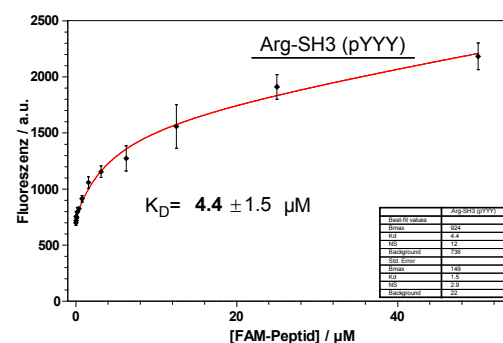
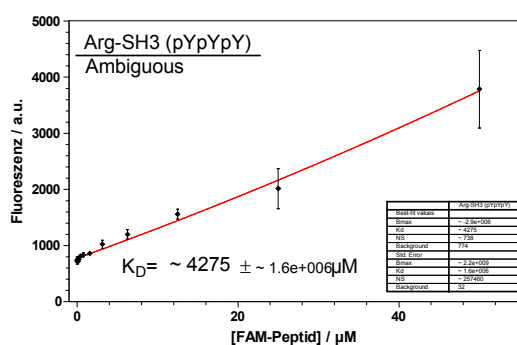
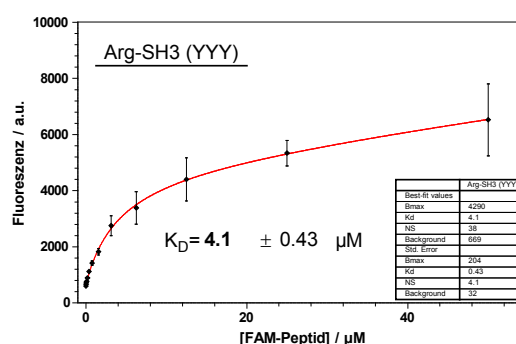
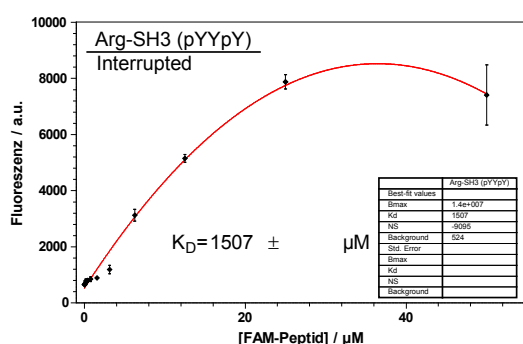
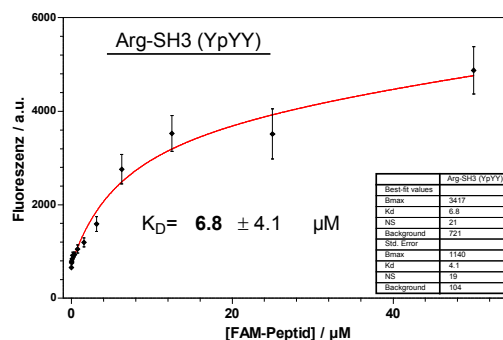
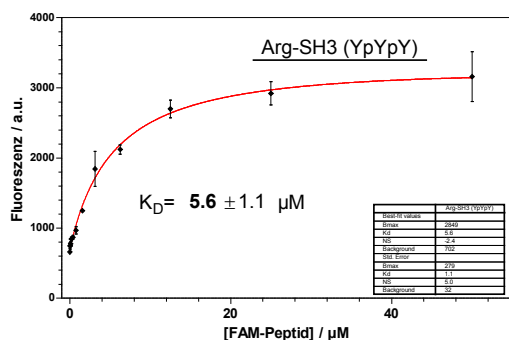
(Phospho)SH3-Domänen von Abl (181-188) auf der Oberfläche mit dem FAM-markierten Peptid der Abl-Interdomäne 206:



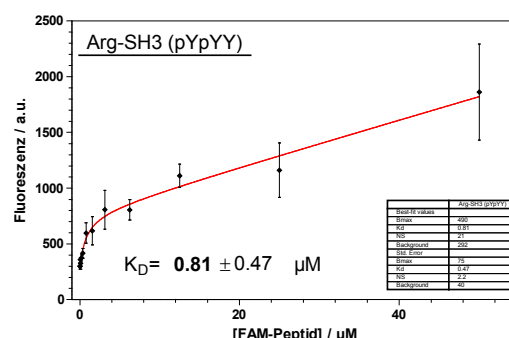
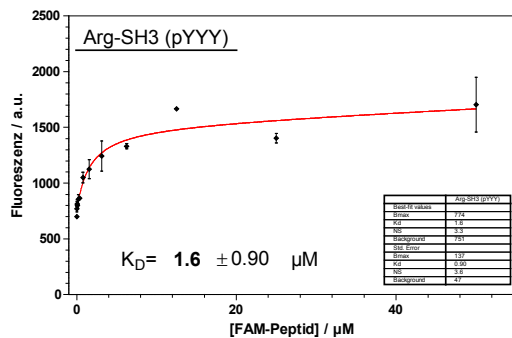
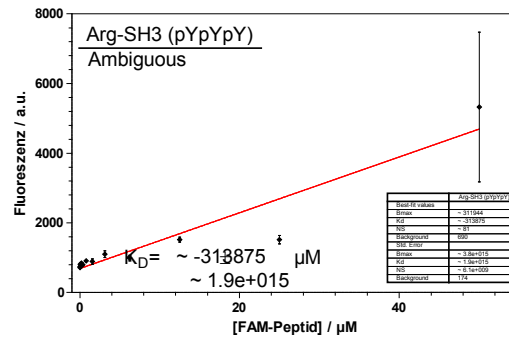
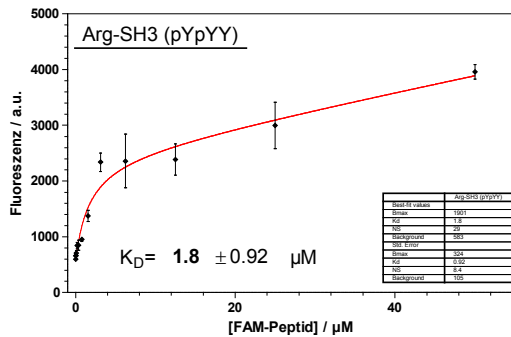
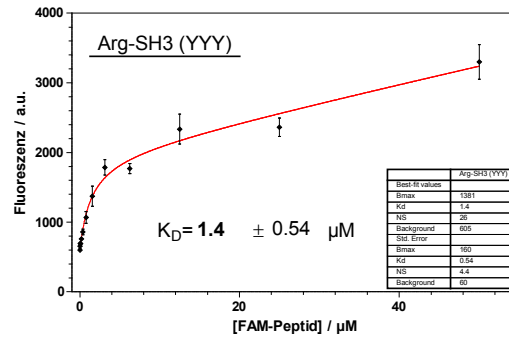
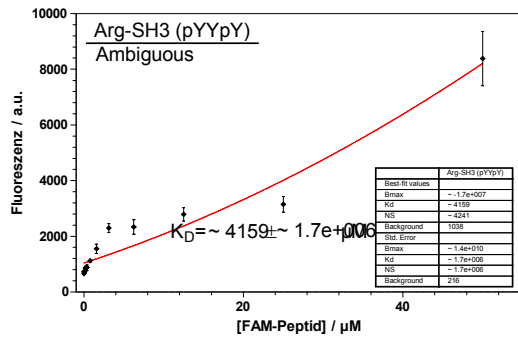
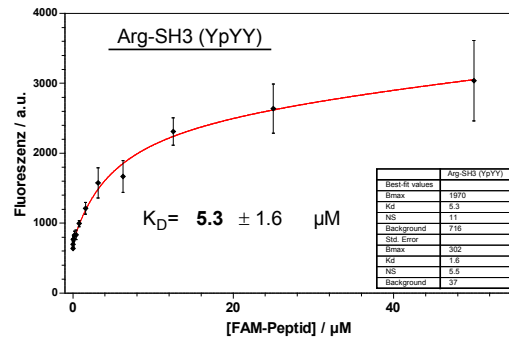
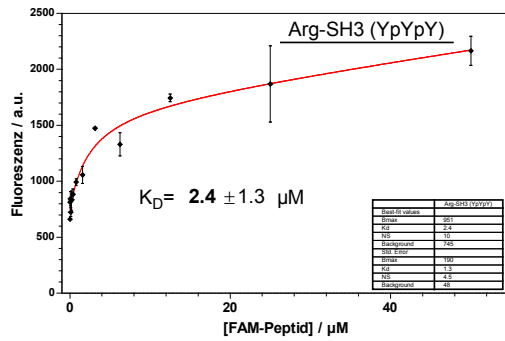
(Phospho)SH3-Domänen von Arg (195-202) auf der Oberfläche mit dem FAM-markierten Peptid von 3BP1 203:



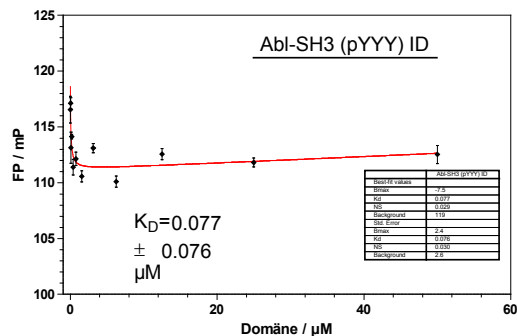
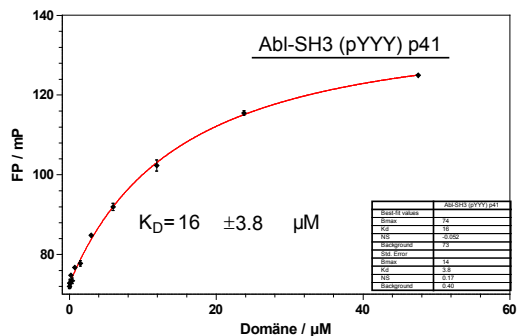
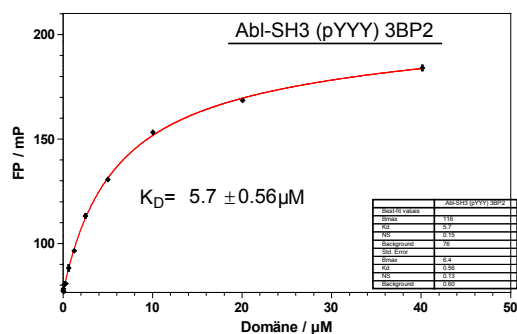
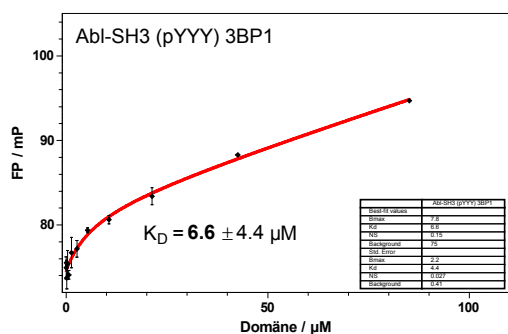
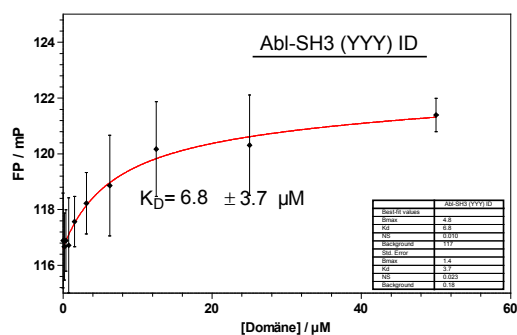
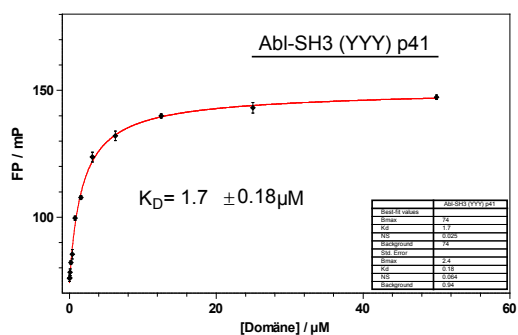
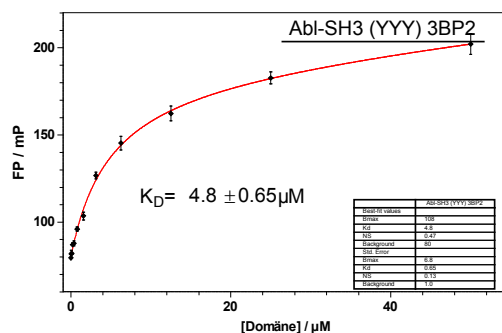
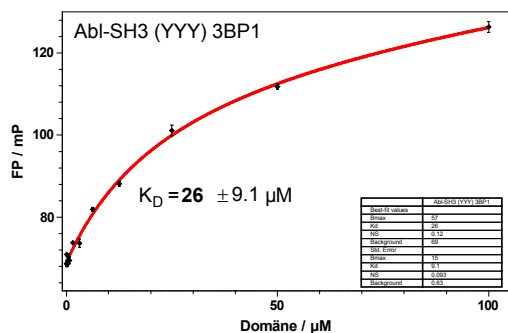
(Phospho)SH3-Domänen von Arg (195-202) auf der Oberfläche mit dem FAM-markierten Peptid von 3BP2 204:



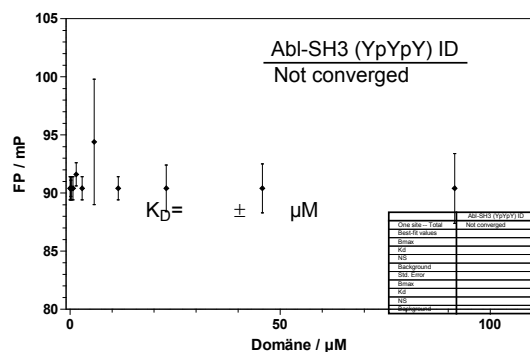
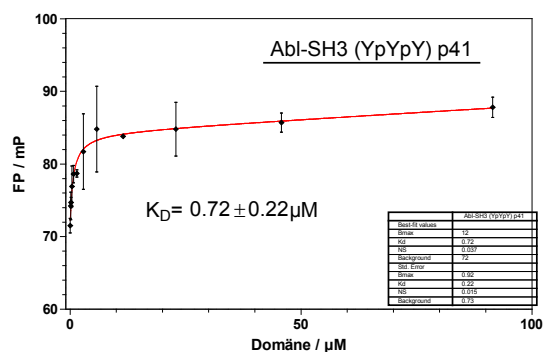
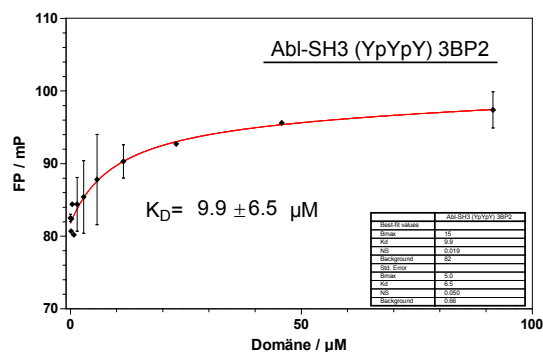
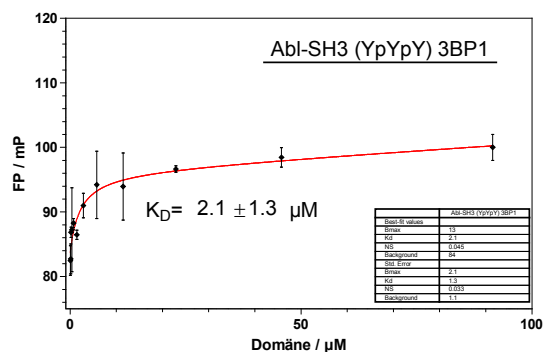
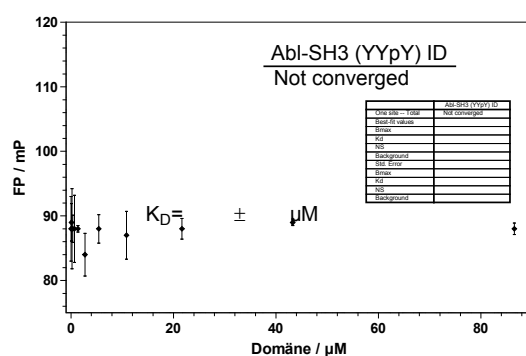
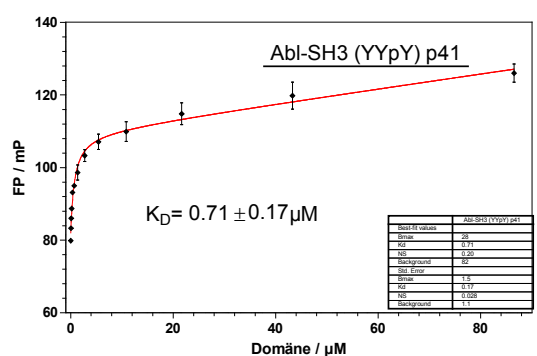
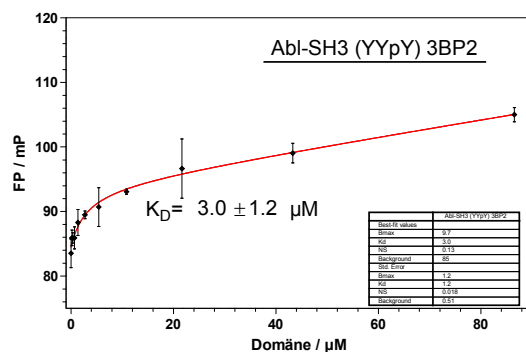
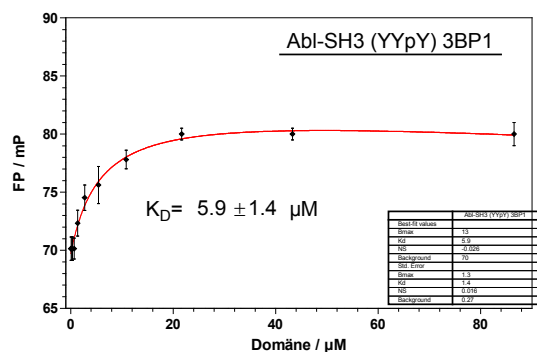
(Phospho)SH3-Domänen von Arg (195-202) auf der Oberfläche mit dem FAM markierten Peptid von p41 205:



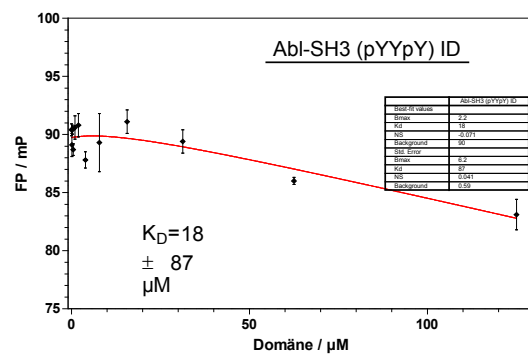
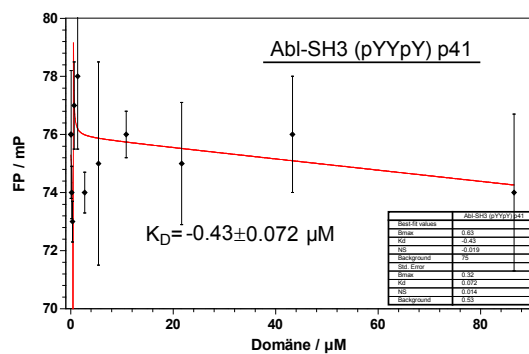
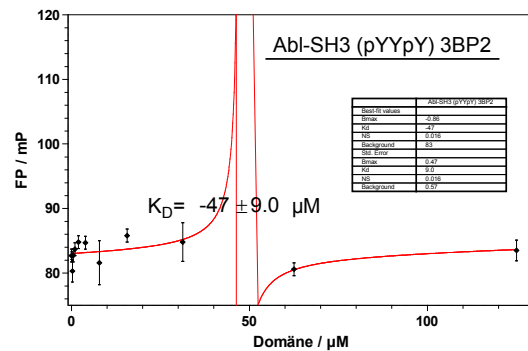
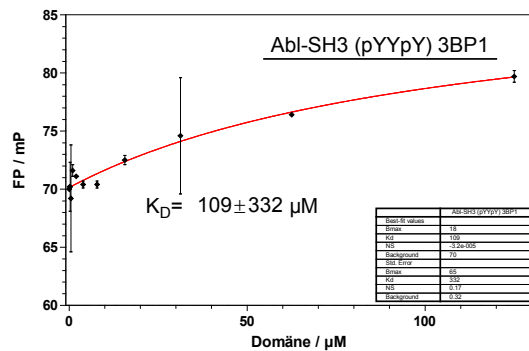
FP-Messung Y⁷Y³⁰Y⁵²-SH3-Domäne von Abl (210) und die pY⁷-Domäne (214) in Lösung mit dem FAM-markierten Peptiden 3BP1 , 3BP2, p41 und ID:



FP-Messung der pY⁵²-SH3-Domäne von Abl (215) und die pY³⁰pY⁵²-Domäne (216) in Lösung mit dem FAM-markierten Peptiden 3BP1 , 3BP2, p41 und ID:

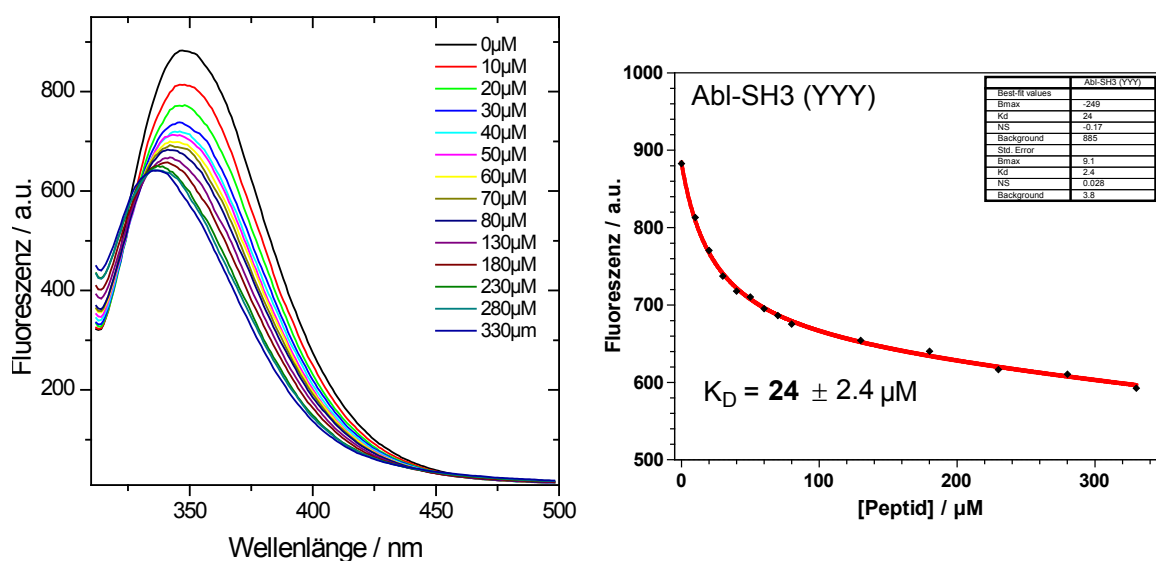


FP-Messung der pY⁷pY⁵²-SH3-Domäne von Abl (217) in Lösung mit dem FAM-markierten Peptiden 3BP1 , 3BP2, p41 und ID:

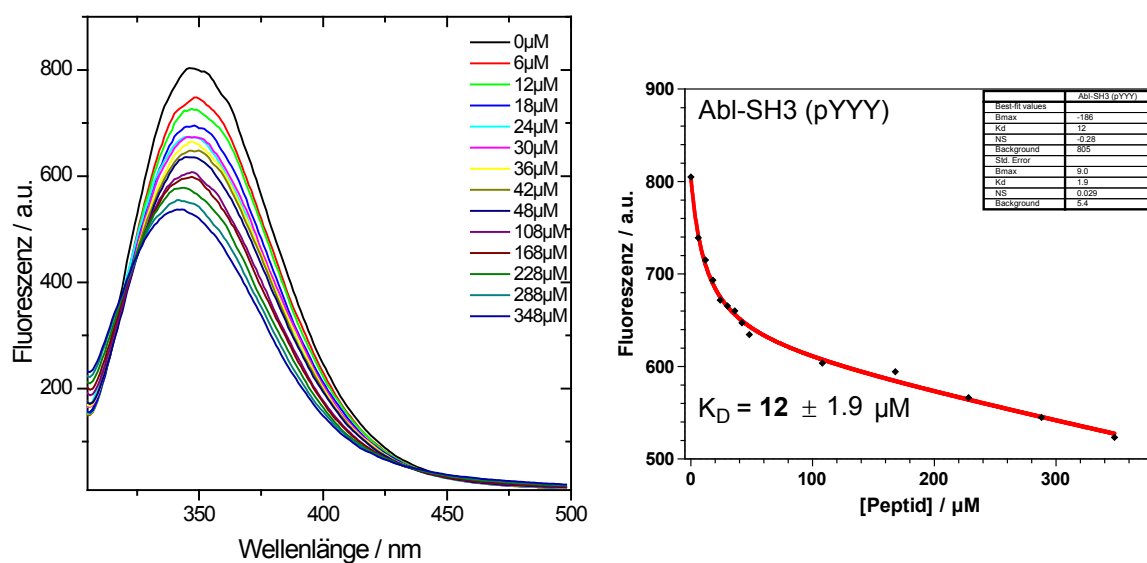


Bindungsisothermen berechnet aus Trp-Emissions bei der Bindung mit markierungsfreien Bindern

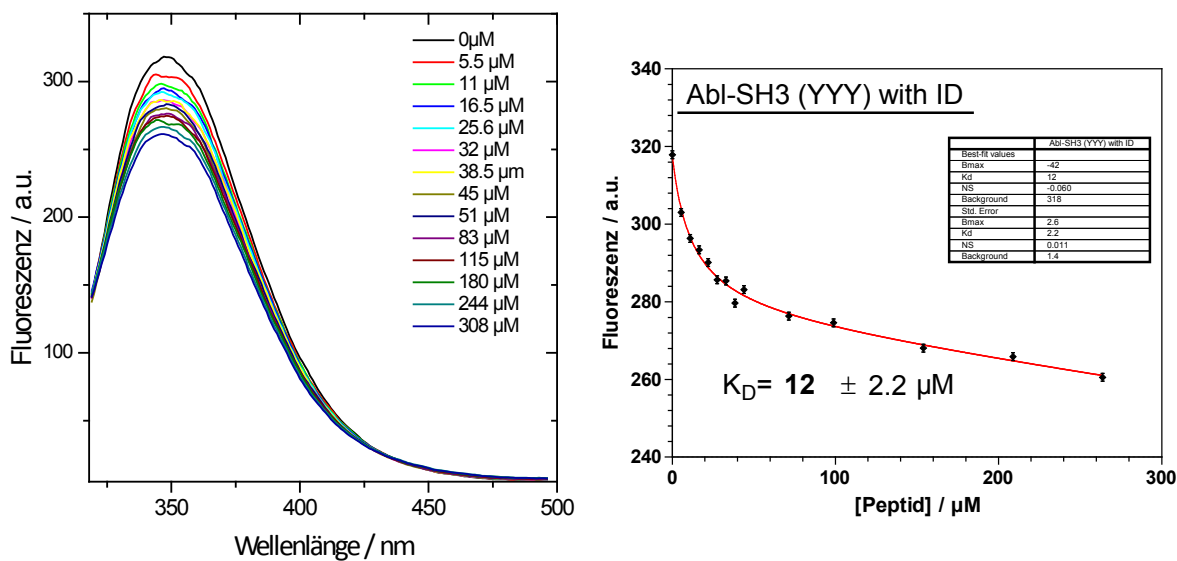
Bindungsmessung des 3BP1' Peptids **219** mit der Y⁷Y³⁰Y⁵² SH3-Domäne **210**:



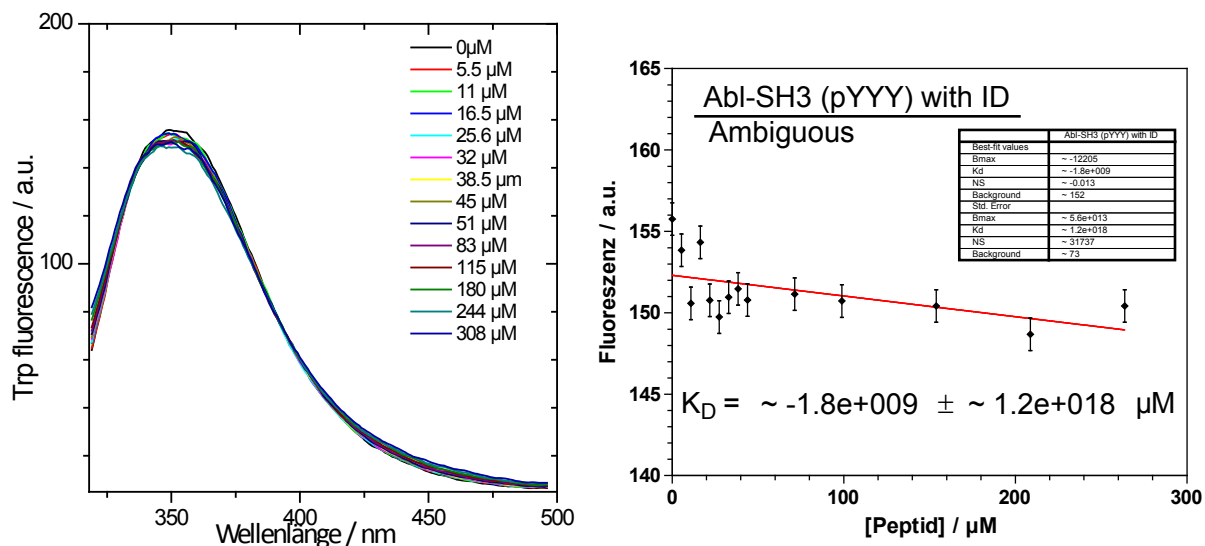
Bindungsmessung des 3BP1' Peptids **219** mit der pY⁷ SH3-Domäne **214**:



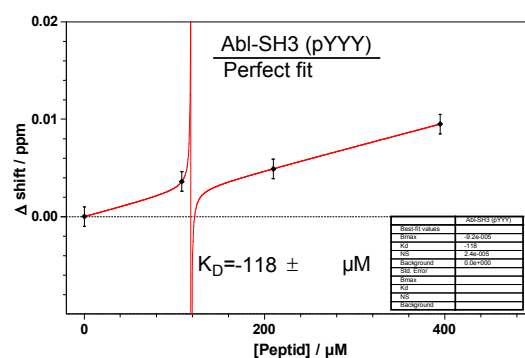
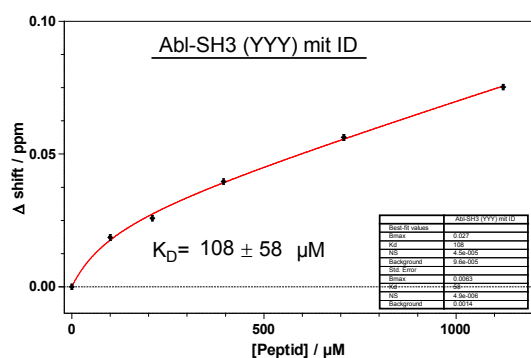
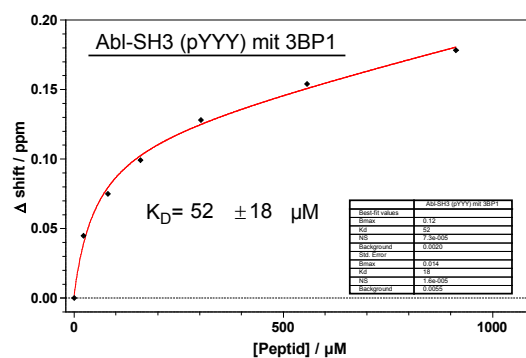
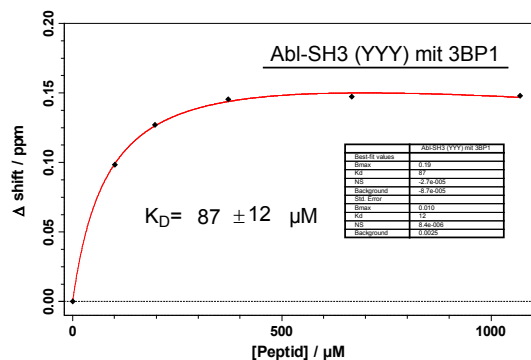
Bindungsmessung des ID' Peptids **220** mit $Y^7Y^{30}Y^{52}$ **210**:



Bindungsmessung des ID' Peptids **220** mit der pY^7 SH3-Domäne **214**:



Bindungsisothermen berechnet aus NMR-Titrationsexperimente beschrieben in Abschnitt 4.7.3



10.4 Angereicherte Proteine des Pulldown-Experiments

Tabelle A 1: Durch die immobilisierte Y^{7Y30Y52}-Domäne **223** selektiv angereicherten Proteine. In der linken Tabe-lenseite sind Proteine angegeben, die über die Signalintensitäten identifiziert wurden (LFQ-Methode). Auf der rech-ten Seite sind die Proteine aufgeführt, die nur in beiden Duplikaten mit der Y^{7Y30Y52}-Domäne angereichert wurden.
* Sequenzen ohne P-X₍₂₋₄₎-P-Motiv

#	Genname	UniProt-ID	log2LFQ_Y YY1/pY1	log2LFQ_Y YY2/pY2	#	Genname	UniProt-ID	Log2#Pep_YYY 1/pY1	Log2#Pep_YYY 2/pY2
1*	ANKRD54	Q6NXT1	1.14	1.11	48	ABI1	B6VEX5	-8.229	-7.644
2*	AP1S1	A0A024QYT6	1.05	1.88	49*	ACN9	Q9NRP4	-7.644	-2.000
3	BCKDK	A0A024QZA9	1.20	1.26	50	ARMC7	Q9H6L4	-7.644	-7.644
4	CBL	P22681	1.89	1.71	51	C12orf73	Q69YU5	-7.644	-2.000
5	CCDC6	A0A024QZJ7	2.42	3.27	52	C14orf80	C9IYA4	-7.644	-8.644
6	CCNK	A0A024R6K1	1.89	1.19	53	CPSF2	B3KN45	-2.459	-2.170
7	CDK12	Q9NYV4	2.98	2.27	54	CTAGE5	Q59FD2	-8.644	-8.229
8	COX11	Q9Y6N1	1.43	1.19	55	DDX46	A8K6X3	-9.451	-8.229
9	CPSF2	B3KN45	2.62	2.42	56	FXR2	P51116	-8.966	-8.229
10	CPSF3	Q53F02	1.27	1.10	57	NFIA;NFIB	B1AKN6	-7.644	-8.229
11	CPSF4	O95639	1.01	1.80	58	RAB7L1;RAB 29	Q6FGU7	-7.644	-7.644
12	DARS	P14868	1.11	1.10	59	RCC2	A5PLK7	-8.229	-2.585
13	DKFZp667 H197	Q69YJ7	1.18	1.26	60	RPAP2	Q8IXW5	-8.644	-8.229
14	DPM1	Q5QPK2	1.04	1.12	61	RPTOR	Q8N122	-7.644	-8.644
15	GEMIN6	Q8WXD5	27.14	27.11	62	SAV1	Q9H4B6	-7.644	-2.000
16	INPPL1	O15357	1.33	2.20	63	SMEK2	Q5MIZ7	-2.000	-8.229
17	KHDRBS1	Q07666	2.17	1.99	64*	SPTAN1;DKF Zp564P0562	A0A024R889	-7.644	-7.644
18	LAMTOR5	O43504	27.58	26.90	65	TSC22D4	Q8IV54	-7.644	-7.644
19	LDB1	Q86U70	1.04	1.21	66	WASL	O00401	-10.103	-3.585
20	LSM4	V9GZ56	26.96	25.91	67	WBP11	B4DMD3	-2.644	-3.000
21	MAGI1	A0A087WXD2	23.03	22.65	68	WIPF2	Q8TF74	-2.807	-9.229
22	MLH1	Q5GJ64	23.94	23.89	69	WIPF3	A0A0A0MSG0	-8.644	-9.451
23	NDUFA4	A0A024R9Z0	3.16	1.19					
24	NDUFB8	O95169	26.61	1.69					
25	NFKBIE	Q7LC14	1.17	23.66					
26	OTUD5	A0A024QZ09	1.38	1.35					
27	PGPEP1	Q9NXJ5	1.39	1.07					
28	PQBP1	O60828	1.27	1.76					
29	PRRC2A	P48634	1.46	1.63					
30*	PSMA3	Q6IB71	1.43	1.10					
31	PTBP2	Q9UKA9	23.80	23.26					
32	RCN3	Q96D15	23.54	23.23					
33*	RPLP0; RPLPOP6	Q53HW2	1.01	2.09					
34*	RPP30	P78346	1.46	1.39					
35	RPS15	K7ELC2	1.21	1.16					
36*	S100A9	B2R4M6	3.12	2.30					

#	Genname	UniProt-ID	log2LFQ_Y YY1/pY1	log2LFQ_Y YY2/pY2
37*	SF3A2	Q05DF2	1.44	2.10
38	SMARCE1	B4DGM3	1.90	2.23
39	SRA1	B3KNT3	1.75	1.09
40	SRSF10	Q5JRI1	1.26	1.16
41	TMOD1	P28289	1.06	24.21
42	UBOX5	Q53HL0	23.39	23.54
43	VASP	A0A024R0V4	2.83	3.27
44	WASF2	Q9Y6W5	1.42	1.79
45	WBP11	B4DMD3	4.20	5.33
46	ZNF598	Q86UK7	1.03	1.00
47		Q6PYX1	2.86	1.72

Tabelle A 2: Durch die immobilisierte pY⁷-SH3-Domäne **224** angereicherten Proteine. Die ersten 13 Einträge sind Proteine, die über die Signalintensitäten identifiziert wurden (LFQ-Methode). Danach sind die Proteine aufgeführt, die nur in beiden Experimenten mit der pY⁷-Domäne angereichert wurden. * Sequenzen ohne P-X₍₂₋₄₎-P-Motiv

#	Genname	UniProt-ID	log2LFQ _pY1/YYY1	log2LFQ _pY2/YYY2	#	Genname	UniProt-ID	#Razor _pY1/Y1	#Razor _pY2/Y2
1 SH2	CRK	L7RT18	3.12	2.85	40	hCG_2025883	A0A024R6U3	2	6
2	IMPAD1	A0A024R7W0	2.23	1.75	41	HEL-S-64p;GSS	V9HWJ1	4	4
3	BCL2L13	Q9BXK5	1.59	1.57	42	HIF1AN	Q9NWT6	2	2
4	MARCKS	A0A087WZH7	1.46	1.85	43	HM13	Q8TCT9	2	4
5	SCARB2	A0A024RDG6	1.27	1.34	44	ICAM2	J3QRT5	2	3
6	NAP1L4	A0A024RCC9	1.26	1.16	45	IRGQ	Q8WZA9	2	300
7	P4HB	A0A024R8S5	1.23	1.00	46	KIAA0101	H0YMA4	200	200
8*	VAPA	Q9P0L0	1.22	1.02	47	KLC1	E7EVH7	2	300
9	HEL-S-165mP	V9HWI0	1.22	1.64	48*	LCN1;LCN1P1	A0A024R8D7	2	2
10	VAPB	Q53XM7	1.22	1.16	49	LTA4H	B4DVZ8	400	400
11	SCARB1	B7ZKQ9	1.18	1.35	50	LTF;HEL110	B2MV14	4	2
12	CPT2	P23786	1.12	1.21	51	MAP2K3	C7DUW4	200	2
13	PNPLA4	A0A024RBU8	1.10	1.35	52	MAPKAPK5	Q8IW41	4	3
#	Genname	UniProt-ID	#Razor _pY1/Y1	#Razor _pY2/Y2	53	MECR	Q9BV79	2	3
14	ALKBH1	Q5XKL0	200	200	54	MED6	A8K3N2	300	200
15	AMY1A	Q6NSB3	6	3	55*	MIS12	A8K1M4	200	200
16	ANKRD13	Q3ZTS7	10	3	56*	MOSPD2	R4GMN1	2.5	6
17	APLP2	B4DTV1	3	200	57	NCK1	B2R6S4	11	7
18*	APOE	J9ZVQ3	400	300	58 SH2	NCK2	O43639	500	700
19*	ARL6IP5	B4DZZ0	3	3	59	NDST1	Q59GK2	200	200
20	B3GNT6;	A0A024R5F9	2	4	60	NT5C;HEL74	J3KRC4	2	2
21	BABAM1;	J3KQS6	3	2	61	PCNP	Q8WW12	400	200
22*	C14orf172	A0A024R6Q2	2	2	62	PDS5B	B7Z5S1	200	4
23	C1GALT1	A0A024RA32	2	300	63	PON2	J3QT77	6	200
24	CCDC90B	B2RE36	4	500	64 SH2	QSOX2	A0A087X176	3	4
25	CCHCR1	A2ABH1	2	2	65	SH2D1B	O14796	200	200
26	CDCA3	B2R749	5	300	66	SLC2A3	Q59F54	2	4
27*	CLDND1	D6RIU2	200	200	67 SH2	SOCS2	A0A024RBD2	200	200
28	CMPK2	Q5EBM0	2	200	68	SOD2	Q7Z7M4	4	3
29	CUEDC2	Q9H467	3	3	69	SSRP1	A0A024R4Z6	200	200
30	CUTA	O60888	200	200	70	STARD4	Q96DR4	200	3
31	DAZAP2	F8VUW5	2	2	71*	STX8	Q9UNK0	4	3
32	DCPS	Q96C86	3	2	72	SUPT6H	Q7KZ85	200	200
33*	DCTN3	X6RA56	2	200	73	THEX1;ERI1	A0A024R355	2	2
34	DKFZp451F173	Q86T62	2	2	74	TMA16	D6RA57	2	2
35	DNMT2	Q6ICS7	7	200	75	TMUB2	K7EKW3	3	2
36	EVA1B	Q9NVM1	2	3	76SH2	TRIM21	P19474	500	500
37	FAM177A1	Q8N128	4	2	77	UAP1L1	Q3KQV9	2	200
38	FLJ22313	A0A024RA77	2	3	78		B7ZLF3	2	300
39*	HAUS1	Q96CS2	4	3					

Tabelle A 3: Sequenzanalyse mit Hilfe der Prosite-Suchmaschine^[257] der durch die immobilisierte Y⁷Y³⁰Y⁵²-SH3-Domäne **223** selektiv angereicherten Proteine. Es wurde nach nicht redundanten Sequenzen der Folge X₇-P-X₍₂₋₄₎-P-X₇ gesucht.

Protein	Prolin-reiche Sequenz	Protein	Prolin-reiche Sequenz
A0A024QZA9_HUMAN	asvlrsgPggglPlrpllgpal	PRC2A_HUMAN_46	kelpreqPlpPgpigtersq
A0A024QZA9_HUMAN_2	ghvaarfPfiPmpldyilpe	PRC2A_HUMAN_47	rtdrgtePgpipPshrpqppvq
A0A024QZA9_HUMAN_3	meshldtPynvPdvvitian	PRC2A_HUMAN_48	pnsoggfrPgtPslhpyrsqp
A0A024QZA9_HUMAN_4	aeastqdPrisPlfghldmhs	PRC2A_HUMAN_49	ppsflysPafcPsplpdtssl
CBL_HUMAN	hhhhhlsPhpPgtvdkkmve	PRC2A_HUMAN_50	psdfystPlqPggqsgflps
CBL_HUMAN_2	gnilqtiPhnkPlfqalidgf	PRC2A_HUMAN_51	vvnfgslPpaPppapppls1
CBL_HUMAN_3	ceikgtePivvdPfdprgsgsl	PRC2A_HUMAN_52	ppslavrPppaPatrvlpspa
CBL_HUMAN_4	agakverPpsPfsmapqasl	PRC2A_HUMAN_53	lgraelhPvelkPfqtyqklss
CBL_HUMAN_5	gslhkdkPlpvPptlrdlppp	PRC2A_HUMAN_54	pwertgpPregPsrraeeggs
CBL_HUMAN_6	svgaesrPqrrPlpctpgdcp	PTBP2_HUMAN	vsasvtPaqsPvlriidnm
CBL_HUMAN_7	rlgdswlPrpiPkvpsapss	PTBP2_HUMAN_2	ksrdytrPdlPsgdgqpald
CBL_HUMAN_8	ltnrhslPfs1Psqmeprpdv	PTBP2_HUMAN_3	etsllavPgalsPlaipnaaaa
CBL_HUMAN_9	smsmnssPlvgPecdhpkikp	RCN3_HUMAN	gaqgkpsPdagPhgggrvhqa
CBL_HUMAN_10	iyslaarPlpvPklppgeqce	RCN3_HUMAN_2	eltaflhPeefPhmrdiviae
CBL_HUMAN_11	edteymtPssrPlrpldtsqs	RCN3_HUMAN_3	adlysaepgeeePawvqterqq
CBL_HUMAN_12	eddgdydvPkpPvpavlarrr	RCN3_HUMAN_4	vghwvlpPaqdpPlveanhllh
CBL_HUMAN_13	vtegsqvPerPkpfprrin	K7ELC2_HUMAN	rkakkeaPmekPevvktlhrd
A0A024QZJ7_HUMAN	lqekldqPvsaPpsprdisme	Q05DF2_HUMAN	akeakeaPaqPapekvkvev
A0A024QZJ7_HUMAN_2	rprrtvssPipyPpssssrpis	Q05DF2_HUMAN_2	fhfkmekPpaPpslpagppg
A0A024QZJ7_HUMAN_3	spdkfkrPtpPpspntqtpv	Q05DF2_HUMAN_3	pplmnglPprPplpeslppp
A0A024QZJ7_HUMAN_4	qPPPPpPppmqPtvpsaatsq	Q05DF2_HUMAN_4	ppgg1plPpmPptgpapsqp
A0A024R6K1_HUMAN	sqgkqgmPhhtPhqlqppsl	Q05DF2_HUMAN_5	pgppqlpPpaPgvhppapvv
A0A024R6K1_HUMAN_2	qpsqssePsqPqqkdpqqa	Q05DF2_HUMAN_6	ppasgvhPpaPgvhppapgv
A0A024R6K1_HUMAN_3	qqqpaqqPkkPspqpsprq	Q05DF2_HUMAN_7	pptsgvhPpaPgvhppapgv
A0A024R6K1_HUMAN_4	eenkaaePppPkipkieth	Q05DF2_HUMAN_8	ppapgvhPpaPgvhppapgv
A0A024R6K1_HUMAN_5	plppahpPpdrkPplaaalgea	Q05DF2_HUMAN_9	ppsagvhPqaPgvhaapav
A0A024R6K1_HUMAN_6	pvdadtlPkvqiPppahpavh	Q05DF2_HUMAN_10	pqapgvhPpaPgmhqpapgv
A0A024R6K1_HUMAN_7	ppplphrPPPPpssymtgm	Q05DF2_HUMAN_11	pqqpgvhPsaPgvhpqppgv
A0A024R6K1_HUMAN_8	gpsygalPpaygPpahlpyphe	Q05DF2_HUMAN_12	psnpgvhPptPmpmlrpp1
A0A024R6K1_HUMAN_9	vyppnPPPPvPpppasfppp	Q05DF2_HUMAN_13	segpgniPPPPpkkkkkkkk
A0A024R6K1_HUMAN_10	ppptpgyPPPPtynpnfpp	B4DGM3_HUMAN	assgitiPkpPkpdpklmp
A0A024R6K1_HUMAN_11	lpthavPphPpglglppa	B4DGM3_HUMAN_2	epymsiqPaedPddyddgfs
A0A024R6K1_HUMAN_12	sypppavPpggqPvpppippp	B3KNT3_HUMAN	ltkrvaaPqdgPrvpasetp
CDK12_HUMAN	srrqsvsPpykePsayqsstrs	B3KNT3_HUMAN_2	ppmgsppPsskaPrsppvgsgp
CDK12_HUMAN_2	srhssisPvrlPlnsslgael	Q5JRI1_HUMAN	nyrrsysPrnrPtgrprsr
CDK12_HUMAN_3	gkeskgsPvflPrkenssvea	TMOD1_HUMAN	kdqttkaPtgPfkreellhd
CDK12_HUMAN_4	etseketPpplPtiasppppl	TMOD1_HUMAN_2	krqkvwvPkqkPldpvlesvt
CDK12_HUMAN_5	tpppqtpPlPplppipalp	TMOD1_HUMAN_3	glnsvikPtqykPvpdeepnst
CDK12_HUMAN_6	hlktstlPplPlpplpgdd	Q53HL0_HUMAN	mvinlclPqfrPrihcnkisa
CDK12_HUMAN_7	dspketlPskPvkkekeqrt	Q53HL0_HUMAN_2	pqcrtlgPaePsvpdkeaft
CDK12_HUMAN_8	rhlltdlPlpPelpggdls	Q53HL0_HUMAN_3	qdalqaPalPmesdcdpgd
CDK12_HUMAN_9	pepkaitPpqPykkprkicc	Q53HL0_HUMAN_4	tleimpcPml1Psgkvidqst

CDK12_HUMAN_10	rlcgspcPavwPdviklpyfn	Q53HL0_HUMAN_5	eatwgrvPsdPftgvaftph
CDK12_HUMAN_11	velskmaPpdlPhwqdechlw	Q53HL0_HUMAN_6	scfsatsPlvlPttsehtakk
CDK12_HUMAN_12	epvknssPapPqpapgkves	Q53HL0_HUMAN_7	spyfkkePvyqlPcghllcrpc
CDK12_HUMAN_13	eelskeaPsaPvilpsaeqt	A0A024R0V4_HUMAN	dgnkrwlPagtgPqafsrvgiy
CDK12_HUMAN_14	nsdknsgPqgPrtrptmpqe	A0A024R0V4_HUMAN_2	ealegggPPPPPalptwsvp
CDK12_HUMAN_15	acpphilPpekrPpeppgpppp	A0A024R0V4_HUMAN_3	rvsnaggPpaPpaggPPPPP
CDK12_HUMAN_16	egdlssaPqelnPavtaallql	A0A024R0V4_HUMAN_4	gPPPPPgPPPPPgllpssgvp
CDK12_HUMAN_17	lsqpeaePpghlPhehgalrpm	A0A024R0V4_HUMAN_5	ahgagggPppaPplpaaqgpg
CDK12_HUMAN_18	dlrfarvPlalhPvvggpflka	A0A024R0V4_HUMAN_6	qeeasggPtaPkaesgrsgg
CDK12_HUMAN_19	ygklyrgPtrvPprggrgrgv	A0A024R0V4_HUMAN_7	esanqeePearvPaqsesvrp
COX11_HUMAN	cgwrwihPgsPtraaervep	A0A024R0V4_HUMAN_8	vttsetqPctPsssdysdlq
COX11_HUMAN_2	csllrarhPalqPprrkssnp	WASF2_HUMAN	nvdassyPppPqsdsassps
COX11_HUMAN_3	afyraknPtdkPvigistyni	WASF2_HUMAN_2	sfsednlPppPaefsyypvdn
B3KN45_HUMAN	kqakksyPmfPapeerikwd	WASF2_HUMAN_3	krssvvsPshPppapplgsp
B3KN45_HUMAN_2	geeseiiPtletPlpphevpgh	WASF2_HUMAN_4	gpkpgfaPppaPPPPppmig
Q53F02_HUMAN	hlmaaeiPnikPdiliiesty	WASF2_HUMAN_5	ppvgfgsPgtPpppspsfp
Q53F02_HUMAN_2	vkqtqaiPytgPfnllcyqlq	WASF2_HUMAN_6	phpdfaaPPPPpppaadyp
CPSF4_HUMAN	eqqlgaqPlpfPgmdksgaav	WASF2_HUMAN_7	pppplsqtggaPPPPPPPPP
CPSF4_HUMAN_2	nylvgfcPegPscckfmhprf	WASF2_HUMAN_8	ftgadggPaiPpplsdttkp
CPSF4_HUMAN_3	pmgtteqPplPqqtqppakq	B4DMD3_HUMAN	ldemefnFvqqqPqlnekvld
SYDC_HUMAN	yvislaePrlPlqlddavrp	B4DMD3_HUMAN_2	hvevesiPlpdmPhapsniliq
SYDC_HUMAN_2	qtvnkqfPcePfkfleptlr	B4DMD3_HUMAN_3	pllgghvPrlPpgrkppgpp
SYDC_HUMAN_3	fyildkyPlavrPfytmpdprn	B4DMD3_HUMAN_4	assqqqaPpqsVPsqiqappm
Q69YJ7_HUMAN	ptfssstvPstasPmntvppppi	B4DMD3_HUMAN_5	pgpppggrPpgPppgpppglp
Q69YJ7_HUMAN_2	ipampslPpmPsippipvpp	B4DMD3_HUMAN_6	pgppprgPpprlPppappgipp
Q69YJ7_HUMAN_3	vptlppvPpvPpippvpsvp	B4DMD3_HUMAN_7	prpgmmrPplvPplgpappgl
Q69YJ7_HUMAN_4	lppmsgmPplnPppvaplpag	B4DMD3_HUMAN_8	tatisakPqitnPkaeitrfvp
Q69YJ7_HUMAN_5	nlnnlnPmflgPlnpvnpigm	B4DMD3_HUMAN_9	vplakaaPksgPsvpsvqtk
Q69YJ7_HUMAN_6	nsqssvkPlpinPddlyvsvhg	ZN598_HUMAN	qlqhechPrcPelppfsifg
Q69YJ7_HUMAN_7	psgqthpPpqtPPrskspsgqk	ZN598_HUMAN_2	eeaaargPedPrgrprsprt
Q69YJ7_HUMAN_8	gkkg1kmPvpgnPavpgmpnag	ZN598_HUMAN_3	eafsvtgPaaPgcvgvpgal
Q69YJ7_HUMAN_9	glpsaglPgaglPstglpgsai	ZN598_HUMAN_4	gpgvglalPyaiPargrsafqe
Q69YJ7_HUMAN_10	glpgagmPsagiPsaggeehaf	ZN598_HUMAN_5	lvssvpkPgtaPtslvsawns
Q69YJ7_HUMAN_11	skeanngPpfnfPgnfggsnaf	ZN598_HUMAN_6	kkvgsekPgttlPqpppatcpp
Q69YJ7_HUMAN_12	gafgdarPgmPsvngsglpg	ZN598_HUMAN_7	ghtegpaParsaPkeppglprp
Q69YJ7_HUMAN_13	apghlggPpafgPpgpgpgpgg	ZN598_HUMAN_8	gsfpcptPqedfPalggpcppr
Q5QPK2_HUMAN	dadlshhPkfiPefirkqkeg	ZN598_HUMAN_9	vvllkgtPPPPPgglvppis
Q5QPK2_HUMAN_2	iisdgvlPccPgwsllgssd	ZN598_HUMAN_10	pgfsgllPsphPacvpspatt
GEMI6_HUMAN	agvltidPpygPencssnei	WASL_HUMAN	mssvqqqPppPrvtnvgsl
SHIP2_HUMAN	pvegerePdpPddrdasdge	WASL_HUMAN_2	ksekrrdPpngPnlpmatvdi
SHIP2_HUMAN_2	gstsisatPgPssplpamet	WASL_HUMAN_3	nelrrqaPPPPPpsrggppp
SHIP2_HUMAN_3	qdmssataPpaPqpstrkakt	WASL_HUMAN_4	ppphnsgPPPPPargrgapp
SHIP2_HUMAN_4	qwssrqlPt1kPiladieylq	WASL_HUMAN_5	sraptaaPPPPPpsrpsvav
SHIP2_HUMAN_5	lsrlfeePekPpptgrppap	WASL_HUMAN_6	pppnrmypPPPPPalpssaps
SHIP2_HUMAN_6	raapreePltPr1kpegape	WASL_HUMAN_7	psvlvgvPvaPPPPPPPPP
SHIP2_HUMAN_7	yyvlegvPhqllPpeppspara	WASL_HUMAN_8	adggestPptPaptsgivga

SHIP2_HUMAN_8	eesggtlPppdfPppplpdsai	A0A0A0MSG0_HUMAN	mpvPPPPPPplPPPPPlgap
SHIP2_HUMAN_9	flppslDPlpgPvvrgrggae	A0A0A0MSG0_HUMAN_2	dlfaggfPvlrPagqrdvag
SHIP2_HUMAN_10	ppppkahPrpPlppgspas	A0A0A0MSG0_HUMAN_3	qpggsraPsprlPnktisgpli
SHIP2_HUMAN_11	lsevdyaPagParsallpgp	A0A0A0MSG0_HUMAN_4	hgaartaPprPnvpppppt
SHIP2_HUMAN_12	lpsdygrPlsfPppriresiq	A0A0A0MSG0_HUMAN_5	PPPPPlPpplPssspiktpl
KHDR1_HUMAN	grsgsmdPsgahPsvrqtpsrq	A0A0A0MSG0_HUMAN_6	pltkgnlPvvaPvpvcapppp
KHDR1_HUMAN_2	rggarasPatqPppllppsats	A0A0A0MSG0_HUMAN_7	PPPPPtPpplPpasvlsdka
KHDR1_HUMAN_3	pdatvggPaptPlppsatas	A0A0A0MSG0_HUMAN_8	qlaplhlPpiPpplpllppc
KHDR1_HUMAN_4	lkervliPvkqyPkfnfvvgkil	A0A0A0MSG0_HUMAN_9	ypglkaePasPaqdaqeppa
KHDR1_HUMAN_5	vrgrgaaPPPPVprgrgv	A0A0A0MSG0_HUMAN_10	ppyascsPraslPapplpgvns
KHDR1_HUMAN_6	atvtrgvPppPtvrpapapr	A0A0A0MSG0_HUMAN_11	setppplPpksPsfqappqka
KHDR1_HUMAN_7	tagiqriPlpPppapetyee	A0A0A0MSG0_HUMAN_12	gaqalpaPpaPpgsqpflqk
KHDR1_HUMAN_8	ddwngtrPslkaPparpvkgay	A0A0A0MSG0_HUMAN_13	agggklnPppaPparspttel
LTOR5_HUMAN	aakltsdPtDiPvvclesdng	A0A0A0MSG0_HUMAN_14	qqatawtPtqqPggqlrngsl
LDB1_HUMAN	ksfklysPkePpnagnafppf	A0A0A0MSG0_HUMAN_15	svedfppPdeykPcqqkiypski
LDB1_HUMAN_2	mldrdvgPtPmyPptylepig	WIPF2_HUMAN	mpiPPPPPPpPgPPPPPtfh
LDB1_HUMAN_3	kwqrmvaPpaePtrqqpskrr	WIPF2_HUMAN_2	nindrsaPilekPkgssggygs
LDB1_HUMAN_4	palgansPwnskPsssqeskse	WIPF2_HUMAN_3	senlagkPalqiPssraaaprp
V9GZ56_HUMAN	tatrgipPswgcPcsaaseppn	WIPF2_HUMAN_4	dssraslPelPrmqrpplpd
V9GZ56_HUMAN_2	slamsrgPgrgaPrpgtqpssh	WIPF2_HUMAN_5	mkhsssaPPPPPgrranap
V9GZ56_HUMAN_3	ggahlSrPlatPlgtwrqsiq	WIPF2_HUMAN_6	paynrekPlpPtqgqrlhpg
A0A087WXD2_HUMAN	edhsalvPpviPnhppsnpep	WIPF2_HUMAN_7	regppapPpvkPppspvnirt
A0A087WXD2_HUMAN_2	lelcrgyPlpfdPddpntslvt	WIPF2_HUMAN_8	psgqslaPPPPPyqqpgvp
A0A087WXD2_HUMAN_3	ngmkdarPssPadvasnssh	WIPF2_HUMAN_9	sptnesaPelPqrhnsLhrk
A0A087WXD2_HUMAN_4	qrgglpvPkksPksqplerkd	WIPF2_HUMAN_10	gpvrklaPppPtsaspslls
A0A087WXD2_HUMAN_5	shstqvlPefPpaeaqaqdq	WIPF2_HUMAN_11	ppsgaaPPPPPpvirngar
A0A087WXD2_HUMAN_6	rsmYenrPmsPspasglsg	WIPF2_HUMAN_12	rmhgsepPsrkgPPPPPsrtpa
A0A087WXD2_HUMAN_7	rilggnePgePiyighivpl	WIPF2_HUMAN_13	eskysfhPvedfPapeeykhfq
Q5GJ64_HUMAN	sdgklkaPpkPcagnqgtqi	C9IYA4_HUMAN	qcealasPgpPaphmeaegp
Q5GJ64_HUMAN_2	tvyaaylPknthPflylsleis	C9IYA4_HUMAN_2	tlvgtcaPevPaaasqptfl
Q5GJ64_HUMAN_3	yftqtllPglaPsgemvkstt	RPTOR_HUMAN	rlecwidPlsmgPqkaletiga
Q5GJ64_HUMAN_4	kldaflqPlskPlssqpqaiv	RPTOR_HUMAN_2	levaaInPnhPlagmplpps
Q5GJ64_HUMAN_5	emsekrpPtssnPrkrhredsd	RPTOR_HUMAN_3	ceatellPmiPdipadlfts
Q5GJ64_HUMAN_6	lidnyvpPleglPifilrlate	RPTOR_HUMAN_4	mrsynctPvssPrlpptymha
Q5GJ64_HUMAN_7	sgqqsevPgSiPnswkwteveh	RPTOR_HUMAN_5	mgvenrnPpeqlPivlqvllsq
A0A024R9Z0_HUMAN	igqakkhPslilPlfvfigtg	RPTOR_HUMAN_6	flsvladPymPaehtmtaf
NDUB8_HUMAN	hmtkdmfPgpyPrtpeeraaa	RPTOR_HUMAN_7	teggsltpvrdsPctprlrsvs
NDUB8_HUMAN_2	gmgygdyPkIPdrsqherdp	RPTOR_HUMAN_8	ssltqsaPasPtnkgvhihq
NDUB8_HUMAN_3	cwvgdvyPvyqPvgpkqypyn	RPTOR_HUMAN_9	qpvsrdlPsgRPgttgpagaq
Q7LC14_HUMAN	lpestsaPasgPsdgspqpct	RPTOR_HUMAN_10	saryfaqPvmkiPeehdlesqi
Q7LC14_HUMAN_2	tlslggPeaedPaprlplphv	RPTOR_HUMAN_11	qiflnrnPgvPsvvkfhpf
A0A024QZ09_HUMAN	tilpkkkPppPdadanep	RPTOR_HUMAN_12	gdvrifdPrmPesvnlqiv
A0A024QZ09_HUMAN_2	sgvvgarPrasPppqgplpgp	RPTOR_HUMAN_13	isclafhPhwPhlavgsndy
A0A024QZ09_HUMAN_3	gavagprPqqasPppcgpgggp	SAV1_HUMAN	psfirhgPtiPrtrtdiclpd
A0A024QZ09_HUMAN_4	igvglgIPsfkPgfaeqslmk	SAV1_HUMAN_2	nqsfllrtPiqrtPheimrresn
A0A024QZ09_HUMAN_5	qarqvrgPsqPrkasatcss	SAV1_HUMAN_3	nhgsedlPlpPgwsvdwtmr

A0A024QZ09_HUMAN_6	qrssassPehPelhaelgmk	SAV1_HUMAN_4	kkaqyrhPcaPsvprydqpp
A0A024QZ09_HUMAN_7	tvlalakPpsPcapgtssqf	SAV1_HUMAN_5	rnqsllyPanPyhtaeipdw
PGPI_HUMAN	rsafvhvPplgkPynadqlgra	CL073_HUMAN	vvhryyrPdltiPeippkrgel
PQBP1_HUMAN	swykvfdPscglPywnadtdl	A8K6X3_HUMAN	tirgtyfPpgkePkegerkiyl
PQBP1_HUMAN_2	rkdeeldPmdPssysdaprg	FXR2_HUMAN	asggdvePglPvevrgsnga
PQBP1_HUMAN_3	gplfqqrPyysPgavlranae	FXR2_HUMAN_2	vtlerlrPvnPnplatkgsf
PRC2A_HUMAN	ksleiqkPavaPrhglqslgk	FXR2_HUMAN_3	rgrrtggPaygPssdvstase
PRC2A_HUMAN_2	aiarrmpPpanlPslkaenkgn	FXR2_HUMAN_4	esekreePnragPgdrdpptrg
PRC2A_HUMAN_3	sdastaqPpesqPlpasqtpas	FXR2_HUMAN_5	tggrgrgPppaPrptsrynss
PRC2A_HUMAN_4	pkrrppaaPentPlvpsgvksw	FXR2_HUMAN_6	issvlkdPdsnPyslldtsep
PRC2A_HUMAN_5	eqssggpPslrPqnsttwardg	FXR2_HUMAN_7	eppvdsePgePppasarrrr
PRC2A_HUMAN_6	dprggglqPsgPpqfpppyrgm	FXR2_HUMAN_8	gdsvsklPkgPsengelsap
PRC2A_HUMAN_7	mppfmyPyPlPfpppygpgg	Q59FD2_HUMAN	lkvvaalPegmrPdsnlygfwp
PRC2A_HUMAN_8	ryrtpdgPsrfPrvagprgsg	Q59FD2_HUMAN_2	afgrehsPygPspglwpsse
PRC2A_HUMAN_9	ppmrlvePvgrPsilkednlk	Q59FD2_HUMAN_3	pptllegPlrlsPlpggggrg
PRC2A_HUMAN_10	dgkkngnsPnsePptpktawae	Q59FD2_HUMAN_4	scdrltdPhraPsdgtslsp
PRC2A_HUMAN_11	srppetePgpPapkpplppp	Q59FD2_HUMAN_5	rrmmfppPgqsyPdsalppqrq
PRC2A_HUMAN_12	gpagnwgPpgdyPdrggppckp	Q59FD2_HUMAN_6	dlgnlnvPdsslPaeneatgpg
PRC2A_HUMAN_13	dkrlkaePaaPpaapstpap	Q59FD2_HUMAN_7	fvppplaPvrgPlfpvdargp
PRC2A_HUMAN_14	pavpkelPapPappasapt	Q59FD2_HUMAN_8	lrrgppfPPPPgamfgasr
PRC2A_HUMAN_15	petepeePaqaPpaqstptpg	Q59FD2_HUMAN_9	yfpvgdfPgpPpapfamrv
PRC2A_HUMAN_16	sgsfeasPvePqlpskegpe	Q59FD2_HUMAN_10	ypprgfpPylPprpgffppp
PRC2A_HUMAN_17	ppeevppPttPvpkvepkg	Q59FD2_HUMAN_11	segrsefPsgliPpsnepateh
PRC2A_HUMAN_18	qhqqgsaPptPvppsppqpv	RPAP2_HUMAN	kffeaqiPktPwvreeerh
PRC2A_HUMAN_19	tlgavpaPqaPPPPkalyp	RPAP2_HUMAN_2	dfvssilPgnrPnstinrpol
PRC2A_HUMAN_20	galgrppPmpPmnfdprwmm	RPAP2_HUMAN_3	eddiisdPdshfPawresqns
PRC2A_HUMAN_21	rllqgrpPldfyPpgvhpsglv	RPAP2_HUMAN_4	eklskvlPgllvPlqitlgdiy
PRC2A_HUMAN_22	mlrergrtPpvdPklawvgdvf	P4R3B_HUMAN	vgcleydPalaqPkrhrefltk
PRC2A_HUMAN_23	atpaepPrPltsPlrqaadedd	P4R3B_HUMAN_2	egkavvaPvekPkpddfpdn
PRC2A_HUMAN_24	kgmrsetPpvPPPPylasy	P4R3B_HUMAN_3	sedkenlPkrtspgkfktfsh
PRC2A_HUMAN_25	gfpengaPgpPisrfpleep	B1AKN6_HUMAN	gerlvksPqcsnPglcvqphhi
PRC2A_HUMAN_26	vakiqtpPpkkePpkeetaqlt	B1AKN6_HUMAN_2	aftqhhrPvitgPrasphatps
PRC2A_HUMAN_27	vgsggggPppPrresrtetr	B1AKN6_HUMAN_3	tlhfptsPiiaqPgpyfshpai
PRC2A_HUMAN_28	gssrrgiPpeePgapprragp	B1AKN6_HUMAN_4	sggkvhnPflPttmlPPPPP
PRC2A_HUMAN_29	ptkveelPpkPleqgdetpk	B1AKN6_HUMAN_5	ppmarpvPlpvPdtkppttst
PRC2A_HUMAN_30	tkgklggPketPpngnlsap	B1AKN6_HUMAN_6	gaasptsPtystPstspanrfv
PRC2A_HUMAN_31	rgggtggPnhPpaprgrtas	B6VEX5_HUMAN	gtlsrtnPptqkPpsppmsgrg
PRC2A_HUMAN_32	egtltqvPlaPpppgappsp	B6VEX5_HUMAN_2	tpyktlePvkPptvpndymt
PRC2A_HUMAN_33	rggrvftPrgvPsrrgrgggr	B6VEX5_HUMAN_3	gsssigiPiavPtpspptigp
PRC2A_HUMAN_34	ppakslaPkkPptgplppsk	B6VEX5_HUMAN_4	vadsptPPPPppddipmfd
PRC2A_HUMAN_35	plkekliPgplsPvarggsngg	B6VEX5_HUMAN_5	dpyadgdPawaPknnyekvva
PRC2A_HUMAN_36	argsegkPsltlPasapgpeea	Q6FGU7_HUMAN	ldskltlPngePvpclllank
PRC2A_HUMAN_37	gdkeappPvlltPkavgtpggg	Q8IV54_HUMAN	vttdyegPgsPgadsptpq
PRC2A_HUMAN_38	spknrsrPpeerPpglplpppp	Q8IV54_HUMAN_2	tgppprlPngePspdpggkgt
PRC2A_HUMAN_39	rqgsvtapGghPrhkgplpqa	Q8IV54_HUMAN_3	prngsppPgaPssrfrvkl
PRC2A_HUMAN_40	qgpsprpPtryePqrvnsglss	Q8IV54_HUMAN_4	aslgglgaPtpPsglsqgpts

PRC2A_HUMAN_41	rdsagvsPfpPkrerrerpprk	Q8IV54_HUMAN_5	pplsassPqqrPpepetgesa
PRC2A_HUMAN_42	sgflgskPegPgpqaesrdt	Q8IV54_HUMAN_6	eemgqvpPldsrPsspalyfth
PRC2A_HUMAN_43	tsrksyrPssmePwmeplspfe	Q6PYX1_HUMAN	ssastkgPsvfPlapssksts
PRC2A_HUMAN_44	lkgaaegPpkrPggssplnav	Q6PYX1_HUMAN_2	cdkthtcPpcPapellggps
PRC2A_HUMAN_45	egppgsePprPppaphdgdr	Q6PYX1_HUMAN_3	iskakgqPrePqvylppsr

Tabelle A 4: Sequenzanalyse mit Hilfe der Prosite-Suchmaschine^[257] der durch die immobilisierte pY⁷-SH3-Domäne **224** selektiv angereicherten 73 Proteine. Es wurde nach nicht redundanten Sequenzen der Folge X₇-P-X₍₂₋₄₎-P-X₇ gesucht. Es wurden 186 Sequenzen in 62 Proteinen gefunden.

Protein	Prolin-reiche Sequenz	Protein	Prolin-reiche Sequenz
Q5XKLO_HUMAN	ypgfifiPnpflPgyqwhvkvq	MAPK5_HUMAN	fansvqfPhessPrarllivme
Q5XKLO_HUMAN_2	rllnhavPrvlPnpegeglph	MAPK5_HUMAN_2	dqgdlmtPqftPyyvapqvle
Q5XKLO_HUMAN_3	latdqnfPlePiedekrdis	MAPK5_HUMAN_3	keksgiiPtsPtpytynksc
Q6NSB3_HUMAN	envaihnPfrPwweryqpvs	MECR_HUMAN	rvkmlaaPinPsdinmiqgn
Q6NSB3_HUMAN_2	npgsrdfPavPysgwdfndg	MECR_HUMAN_2	eealiqvPsdiPlqsaatlqv
Q6NSB3_HUMAN_3	nlnsnwfPegskPfiyqevidl	A8K3N2_HUMAN	rkqqrqsPaqviPladdyiag
Q3ZTS7_HUMAN	ecatannPtaitPdeyfeefnd	A8K3N2_HUMAN_2	pkfvqlkPgekPvpvdqtke
Q3ZTS7_HUMAN_2	dfiklefPpgfPvkieiplfh	B2R6S4_HUMAN	ivkvkrkPsvPdsaspadds
B4DTV1_HUMAN	ddyneenPtePgsgdgtmsdk	B2R6S4_HUMAN_2	vmdviekPendPewwckrkin
B4DTV1_HUMAN_2	ithdvkvPptPlptndvdvy	B2R6S4_HUMAN_3	pltsoglePspPqcdyirpsl
B4DTV1_HUMAN_3	laalqsdPprPhrilqalrr	Q59GK2_HUMAN	lkdcsinPksPllyvtrpse
B4DTV1_HUMAN_4	seeseeiPpfhPfhpfpalpe	Q59GK2_HUMAN_2	vtsteeyPhlkParyrrgfi
B4DTV1_HUMAN_5	hgivevdPmltPeerhlnkmq	Q59GK2_HUMAN_3	ifseekdPlwqdPcedkrhkdi
A0A024R5F9_HUMAN	dqyfeffPpsPrsvdqvkaq	J3KRC4_HUMAN	rgfrrrfPeePhvpleqrrg
A0A024R5F9_HUMAN_2	sryeaavPdprePgfallrsc	J3KRC4_HUMAN_2	ahlvhllPgsaPgpadketa
A0A024R5F9_HUMAN_3	fyvglctPcqaPtnysrwnl	PCNP_HUMAN	eeeeadlPtkPtkiskfgfa
A0A024R5F9_HUMAN_4	peesllrPayvvPwqdpwepfy	PCNP_HUMAN_2	iklgsskPketvPtlapktlsv
J3KQS6_HUMAN	gpkswqvPppaPevqirtprv	PCNP_HUMAN_3	nededsePeemPpeakrmkn
J3KQS6_HUMAN_2	tilvysrPpcqPqfsltepmk	B7Z5S1_HUMAN	difriyaPeaPytspdkld
J3KQS6_HUMAN_3	makllahPlqrPcqshasysl	B7Z5S1_HUMAN_2	itkklgnPkqPtnpflemik
A0A024RA32_HUMAN	wllskydPeePiyfgrfrfkp	B7Z5S1_HUMAN_3	ekllsllPeyvvPytihllahd
A0A024RA32_HUMAN_2	igketfhPfvPehhlikgyl	B7Z5S1_HUMAN_4	ttyslesPkdPvlparfftq
A0A024RA32_HUMAN_3	ywnynyyPpvegPgccsdslavs	B7Z5S1_HUMAN_5	emksfftPgkPkttnvlgav
A0A024RA32_HUMAN_4	gylyryqPtlPerilkeisq	B7Z5S1_HUMAN_6	nassssnPsPgrigrldds
B2RE36_HUMAN	kegydrPvditPleqrklftd	J3QT77_HUMAN	pglhfsaPdkPggitlmdlk
A2ABH1_HUMAN	pshfqarPlstlPrmaptwlsd	J3QT77_HUMAN_2	qklfvydPnnPpssevlriq
A2ABH1_HUMAN_2	vnavsscPlpPpvtdivslel	SH21B_HUMAN	iqtaegsPkqvfpSlkeliskf
A2ABH1_HUMAN_3	kksvvssPrpPecasapva	Q59F54_HUMAN	vaffeigPgpiPwfivaelfs
B2R749_HUMAN	mgsaksvPvtParppphnhk	Q7Z7M4_HUMAN	srqkhsldlPydygaleph
B2R749_HUMAN_2	piqvessPqpglPageqlglk	Q7Z7M4_HUMAN_2	hlqiaacPnqdPlqgttgilip
B2R749_HUMAN_3	mktssgdPpsPlvkqlsevf	A0A024R4Z6_HUMAN	sfdigdqPvfeiPlsnvsqctt
B2R749_HUMAN_4	edsksnlPpePvlppeapls	A0A024R4Z6_HUMAN_2	evkkgkdPnaPkrpmsayml
B2R749_HUMAN_5	skeearqPtetPvasqssdkp	STAR4_HUMAN	pcgwfcvPlkdnPnqslitgyi
CMPK2_HUMAN	arrllrgPlsgPllgrrgvca	SPT6H_HUMAN	gqeameaPmaPpeeeedde
CMPK2_HUMAN_2	rsyslcvPvtPdaggcarvr	SPT6H_HUMAN_2	ivdddggPlkkPkwrklpgy
CMPK2_HUMAN_3	qgflldPlddPdtrqallel	SPT6H_HUMAN_3	yeqisadPdkPladgiral
CMPK2_HUMAN_4	vgcaqvvpvpePlhpvpvdl	SPT6H_HUMAN_4	rheteqfPaePlelakdyvc
CMPK2_HUMAN_5	sgglqhlPpahhPvyqwpedll	SPT6H_HUMAN_5	ynwlrvPyPdqqvveeddd
CUED2_HUMAN	gvledlgPsgPseenfdmea	SPT6H_HUMAN_6	iktkkekPtifiPyficackel
CUED2_HUMAN_2	sgvqqqvPisPeplqrpeml	SPT6H_HUMAN_7	kfillgyqPrqgPrieyvtvtp
CUED2_HUMAN_3	gpaawegPnqdlPrllrgpqkd	SPT6H_HUMAN_8	dhyqdpvPgitiPsssrtrtp
CUED2_HUMAN_4	edqkihrPmaPkeapkkli	SPT6H_HUMAN_9	vtgqqgnPnatPaqwassqyg

CUTA_HUMAN	llsfvwmPallPvasrlllllp	SPT6H_HUMAN_10	ayhvfptPaqqPvatplmtps
CUTA_HUMAN_2	ltmasgsPptqPspasdsqsg	SPT6H_HUMAN_11	syttpsqPittPqyhqlqast
F8VUW5_HUMAN	gplgstiPmayyPvgpiyppgs	SPT6H_HUMAN_12	kqkqrltPrpsPspmiestpm
F8VUW5_HUMAN_2	gatagniPPPPPGcoppnaaq	A0A024R355_HUMAN	rpeggeePprPspeetqqck
DCPS_HUMAN	vngtcaPvrlPfsqftrlqkv	A0A024R355_HUMAN_2	msvssslPiegtPppqmpfrk
DCPS_HUMAN_2	rsldrldtPehlPllrnilhqg	K7EKW3_HUMAN	agagsssPeaPlrsedstcl
Q86T62_HUMAN	gfdrhtsPvfsPanpessmed	K7EKW3_HUMAN_2	ihchrspPgsvPgpsaslaps
Q6ICS7_HUMAN	fdmilmsPpcqPftrigrqgd	UAP1L_HUMAN	aaecarPhgPppdlaarl
Q6ICS7_HUMAN_2	klqseplPfqaPgqvlmefpk	UAP1L_HUMAN_2	kvvekeyPeePvgvvcqvdg
Q6ICS7_HUMAN_3	anllgfpPefgfPekitvkqry	UAP1L_HUMAN_3	avtrefePllkPhvavkkvpy
EVA1B_HUMAN	visiswaPrprPrqpaqrrdp	UAP1L_HUMAN_4	eegnlvkPlkPngikmekfv
EVA1B_HUMAN_2	dtvtrlgPddtlPgpelsaepd	UAP1L_HUMAN_5	dahgawlPelPslppngdpp
F177A_HUMAN	lekdvlpTvdPtkltwgpyl	B7ZLF3_HUMAN	rglvihhPaeeqPyrclpcgqt
A0A024RA77_HUMAN	thlsnvypskPltkdqrlvy	B7ZLF3_HUMAN_2	rthtgerPfpcPecgrcfslk
A0A024RA77_HUMAN_2	lvctsrtpssPksstnresh	B7ZLF3_HUMAN_3	qrtharmPaphPrprgvgfer
A0A024RA77_HUMAN_3	gnvdnqfPgqaaPpgfpvypaf	L7RT18_HUMAN	yiinssgPrpPvppspaqp
A0A024RA77_HUMAN_4	qatsnvnPtqPttsqplnla	L7RT18_HUMAN_2	qegshpqPlggPegpyaqs
A0A024RA77_HUMAN_5	hvpgeepPpaPnlvagenrp	A0A024R7W0_HUMAN	ilkevttPkevPaesvtvwid
A0A024R6U3_HUMAN	alsilmlPhniPsslslltsm	B2L13_HUMAN	gfdrhtsPvfsPanpessmed
V9HWJ1_HUMAN	sevvsysaPftlfPslvpsalle	B2L13_HUMAN_2	dnsgqvsPpesPtvttswqse
V9HWJ1_HUMAN_2	gmlemllPgqPeavarlrar	B2L13_HUMAN_3	swhteslPvslgPeswqqiamd
V9HWJ1_HUMAN_3	fencllrPgsParvvqcise	B2L13_HUMAN_4	relqealPeaPapllphita
HIF1N_HUMAN	qlrsysfPtrPiprlsqsd	B2L13_HUMAN_5	teveevvPalePtetllseke
HIF1N_HUMAN_2	feclypyPvhhPcdrqsqvdf	B2L13_HUMAN_6	spasekkPvpPsegksrlsp
HIF1N_HUMAN_3	lgealgnPqevgPlntmikgr	A0A087WZH7_HUMAN	aegeaaePgsPtaaageaas
HM13_HUMAN	ptnsttrPpstPegialaygs	A0A087WZH7_HUMAN_2	edgatpsPsnPkkskkrfsf
HM13_HUMAN_2	pfmnkffPasfPnrqyqlift	A0A087WZH7_HUMAN_3	egaaggdPqeakPqeaavapek
HM13_HUMAN_3	fsyeesnPkdPaavteskeg	A0A087WZH7_HUMAN_4	saaaceaPsaagParprsggsp
J3QRT5_HUMAN	ftiecrvPtvePldsltlflf	A0A087WZH7_HUMAN_5	apsqeaqPecsPeappaaae
IRGQ_HUMAN	dvetleaPegrPdsgvpslra	A0A024RDG6_HUMAN	afdswekPplPvytqfyffn
IRGQ_HUMAN_2	flgelscPpaaPgpwaaeanv	A0A024RDG6_HUMAN_2	slihvfrPdisPyfglfyekn
IRGQ_HUMAN_3	gpegngePlaPalgeaalaa	A0A024RCC9_HUMAN	qerldnvPhtPssyietlpk
IRGQ_HUMAN_4	dmllgldPgdpGaapasvpt	A0A024RCC9_HUMAN_2	ataeepdPkgiPefwftifrn
IRGQ_HUMAN_5	aptpfpaPerPnvvlwtvpl	A0A024RCC9_HUMAN_3	ikvkvfsdPgqPmsfvlefhf
IRGQ_HUMAN_6	dalilvtPgaPtekdwavq	A0A024RCC9_HUMAN_4	tykmksePdkadPfsfegpeiv
IRGQ_HUMAN_7	wevleeaPppvfPlrpgglpgl	VAPA_HUMAN	tvsvmlqPfdydPnekskhkfm
IRGQ_HUMAN_8	galllalPpasPsaartkaaa	VAPA_HUMAN_2	dklndmePskavPlnaskqdg
HOYMA4_HUMAN	nkyaggnPvcvrPtpkwkgig	V9HWI0_HUMAN	alkedvgPgkavPreelfvtsk
E7EVH7_HUMAN	rpvhfyiPenesPleqklrklr	V9HWI0_HUMAN_2	lwntkhhPedvePalrktladl
E7EVH7_HUMAN_2	iyqtklgPddPnvaktknnl	V9HWI0_HUMAN_3	sdrawdPdePvlleevvvl
B4DVZ8_HUMAN	ihcrailPcqdtPsvkltytae	V9HWI0_HUMAN_4	qrkviciPkstPsrilqnkv
B4DVZ8_HUMAN_2	airdgetPdpedPsrkiykfiq	Q53XM7_HUMAN	nvsvmlqPfdydPnekskhkfm
B4DVZ8_HUMAN_3	qydllvlPpsfPyggmenpcl	B7ZKQ9_HUMAN	nlinkyfPgmpfPkdkgflfa
B4DVZ8_HUMAN_4	wnawlysPglPpikpnymt	B7ZKQ9_HUMAN_2	gtsggmwPpfmtPesslefysp
B2MV14_HUMAN	iy eaglaPyklrPvaaevygte	B7ZKQ9_HUMAN_3	slfldihPvtgiPmncsvklql
B2MV14_HUMAN_2	pflnwtgPpePieaavarfff	B7ZKQ9_HUMAN_4	gqtgkiePvvlPllwfaesga

10. Anhang

B2MV14_HUMAN_3	yfsqscaPgSDPrsnlcalci	CPT2_HUMAN	rlllrawPrgPavggpgapsr
C7DUW4_HUMAN	espassqPasmPqskgkskrk	CPT2_HUMAN_2	mhyqds1PrlPipkledtir
C7DUW4_HUMAN_2	riscmskPpaPnptpprnld	CPT2_HUMAN_3	yilsdssPapefPlayltsenr
C7DUW4_HUMAN_3	tmdagckPymaPerinpe1nq	CPT2_HUMAN_4	fkdstqtPavtPqsqpattds
C7DUW4_HUMAN_4	lkqvveePspqlPadrfspfv	A0A024RBU8_HUMAN	ggltnalPilPvgrtvtisp

Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank *Prof. Dr. Oliver Seitz* für die Möglichkeit meine Promotion in seinem Arbeitskreis erarbeiten zu können. Darüberhinaus danke ich ihm für das das interessante Thema und die Bereitschaft wissenschaftliche und bürokratische Hürden zu diskutieren und zu bewältigen. Desweiteren bedanke ich mich, dass er als Mentor des Gründungsprojektes *EnviroPep* fungiert.

Weiterhin bedanke ich mich bei *Victor Bandlow* für die Arbeiten im Rahmen seines Forschungspraktikums. Ich bedanke mich bei *Philipp Zimmermann*, *Paul von Golaszewski*, *Michael Krumrey* und *Olaf Fuchs* für die unterstützende Forschungsarbeit und gründliche Erstellung ihrer Bachelorarbeit. Darüberhinaus habe ich Unterstützung durch die Auszubildenden: *Andre Reinprecht*, *Anne Mohr* und *Lukas Pauldar* erhalten. *Anett Hauser* und *Olaf Fuchs* haben mich außerdem kurzzeitig als studentische Hilfskräfte unterstützt. Bei allen genannten Personen möchte ich mich bedanken und hoffe, dass ich ihnen etwas beibringen konnte.

Bei *Christina Klotz* möchte ich mich für die Expression der SH3-Domänen von YSC84 und Abl bedanken. Ich möchte mich weiterhin beim Arbeitskreis *Prof. Dr. Michael Linscheid* für die Messungen der hochaufgelösten Massen bedanken, besonders die Messungen der Ni^{2+} -Oberflächen-verdrängten His_6 -Peptide/Proteine. Desweiteren gebührt mein Dank *Dr. Andre Dallmann*, für die zahlreichen NMR-Messungen der Abl-SH3-(Phospho)Domänen. An *Dr. Christina Kuznia* ist mein Dank gerichtet für die Kultivierung und Präparierung der K562-CML-Zellen. Beim Arbeitskreis *Dr. Eberhard Krause*, insbesondere bei *Dr. Michael Schümann* und *Annika Manns*, möchte ich mich für die Zusammenarbeit bei der Analyse der Pulldown-Proteine bedanken.

Ein besonderer Dank geht an meine Laborkollegen aus 2‘112 mit denen ich eine sehr gute Zeit bei der Arbeit hatte. Fast im gleichen Maße gilt dies für den gesamten Arbeitskreis Seitz. *Henrik Petszulat* und *Gunnar Bachem* haben mir außerdem Chemikalien und Peptide zur Verfügung gestellt für die ich mich bedanke. *Simon Loibl* danke ich für die vielen fachlichen Gespräche und die Durchsicht meiner Arbeit.

Ich danke weiterhin meiner Familie und meinen Freunden für die Unterstützung, das Verständnis und die Ablenkung von der Chemie während der Promotion und *Melanie Arndt* insbesondere für ebendies sowie für die Durchsicht und Korrektur meiner Arbeit.

Publikationsverzeichnis

- G. K. Windler, M.-X. Zhang, R. Zitterbart, P. F. Pagoria, K. P. C. Vollhardt, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 6588-6603: „*En route to dinitroacetylene: nitro(trimethylsilyl)acetylene and nitroacetylene harnessed by dicobalt hexacarbonyl*“
- K. Brückner, R. Zitterbart, O. Seitz, S. Beck, M. W. Linscheid, *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*, 1069-1077: „*Solid Phase Synthesis of Short Peptide-Based Multi-metal Tags for Biomolecule Labeling*“
- R. Zitterbart, O. Seitz, *Patentanmeldung beim DPMA*, 2016012912064300DE, **2016**: „*Linkermolekül und Verwendung desselben in Verfahren zur Reinigung von Peptiden*“
- R. Zitterbart, O. Seitz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *25*, 7252-7256: „*Parallel Chemical Protein Synthesis on Surface Enables the Rapid Analysis of the Phosphoregulation of SH3 Domains*“ *Angew. Chem.* **2016**, *25*, 7368-7373: „*Parallele chemische Proteinsynthese auf der Oberfläche zur schnellen Analyse der Phosphoregulierung von SH3-Domänen*“
- S. F. Loibl, R. Zitterbart, Z. Harpaz, O. Seitz, *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 6753-6759: „*Total chemical synthesis of proteins without HPLC purification*“
- R. Zitterbart, M. Krumrey, O. Seitz. *J. Pep. Sci.* **2017**, DOI: 10.1002/psc.3006: „*Investigation of immobilization methods for the rapid parallel synthesis of PTM-modified SH3-Domains*“

Auszeichnungen und Ehrungen

- 2013:** Posterpreis beim *Peptid Arrays* Symposium in Edinburgh für das Poster: „*Chemical Synthesis of Protein-Domain-Arrays: Through Self-Purifying Fmoc-based Solid Phase Peptide Synthesis of Peptide Thioesters*“
- 2016:** Erhalt der EXIST-Forschungstransfer Förderung für das Projekt: „*Skalierbare, parallele & nachhaltige Reinigung von Peptiden, EnviroPep*“ durch das BMWi und den Europäischen Sozialfond

Selbstständigkeitserklärung

Ich, Robert Zitterbart, erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und erarbeitet habe. Alle verwendeten Quellen und Hilfsmittel wurden an entsprechender Stelle angegeben.

_____, Berlin der